

SÉRIE A, N° 3344

N° D'ORDRE :

4216

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences physiques

PAR

CLAUDE PÉAUD-LENOËL

PREMIÈRE THÈSE :

LA PRÉPARATION ET LE MODE D'ACTION
DE LA LEVANE-SUCRASE :
UN ENZYME DE *BACILLUS SUBTILIS*

DEUXIÈME THÈSE :

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 10 Janvier 1957 devant la Commission d'examen

M. R. WURMSER,	<i>Président</i>
M. C. FROMAGEOT,	<i>Examinateur</i>
Mme P. CHAIX,	<i>Examinateur</i>

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PERES

PROFESSEURS

G. JULIA.....	T Analyse supérieure et	WIEMANN	T Chimie organ structur.
	Algèbre supérieure.	JACQUINOT	T Spectroscopie et Phy-
FOCH	T Mécanique physique et		sique céleste.
	expérimentale.	VASSY	T Physique de l'atmosph.
PAUTHENIER	T Electrotech. générale.	DESTOUCHES	T Théories physiques.
DE BROGLIE.....	T Théories physiques.	PRUVOST	T Géologie.
PRENANT	T Anat. et histol. comp.	AMIEL	T Chimie (P.C.B.).
GARNIER	T Géométrie supérieure.	HOGART	T Minéralogie.
PERÈS	T Méc. des fluides et appl.	J.-P. MATHIEU.....	T Physique (P.C.B.).
LAUGIER	T Physiologie générale.	COUTEAUX	T Biol. animale (P.C.B.).
M. CURIE	T Physique (P.C.B.).	MAY	T Biol. animale (P.C.B.).
BARRABE	T Géologie structurale et	CHOQUET	T Calc. différ. et inté.
	Géologie appliquée.	FELDMANN	T Biologie (P.C.B.).
G. DARMOIS.....	T Calcul des probabilités	GUINIER	T Physique (P.C.B.).
	et Phys. mathémat.	JOST	T Biologie (P.C.B.).
J. BOURCART....	T Géographie physique et	FORTET	T Calcul des probabilités.
	Géologie dynamique.	SCHWARTZ	T Méthodes mathémati-
PLANTEFOL	T Botanique.		ques de la physique.
GRASSE	T Evol. des êtres organ.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
PRÉVOST	T Chimie organique.	MALAVARD	T Aviation.
BOULIGAND	T Appl. de l'analyse à la	BRELOT	T Calcul différentiel.
	Géométrie.	NORMANT	T Chimie (P.C.B.).
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	BENARD	T Chimie (P.C.B.).
WYART	T Minéralogie.	BUVAT	T Botanique (E.N.S.).
TESSIER	T Zoologie.	DUGUE	T Statist. mathématiques.
MANGENOT	T Biologie végétale.	GÉLOSO	T Chimie (S.P.C.N.).
P. AUGER.....	T Physique quantique et	SOULAIRAC	T Psychophysologie.
	Relativité.	ULRICH	T Physiologie végétale.
MONNIER	T Physiol. des fonctions.	MARÉCHAL	T Optique théor. et appl.
PIVTEAU	T Géologie.	KIRMANN	T Théories chimiques.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	CHADEAUD	T Botanique.
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	DESTRIAU	T Physique (M.P.C.).
LAFFITTE	T Chimie générale.	M ^{lle} LE BRETON.....	T Physiologie générale.
FAVARD	T Mécanique générale.	SALEM	T Mathématiques génér.
COULOMB	T Physique du globe.	LELONG	T Mathématiques génér.
M ^{lle} COUSIN.....	T Biol. animale (P.C.B.).	DEVILLERS	T Anat. et Histol. compar.
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	EHRESMANN	T Topologie algébrique.
P. DRACH	T Zoologie.	FRANÇON	T Physique (M.P.C.).
KASTLER	T Physique.	GLANGEAUD	T Géographie physique et
EPHRUSSI	T Génétique.		Géologie dynamique.
WURMSER	T Biol. physico-chimique.	GODEMENT	T Mathématiques (M.P.C.).
RIVIÈRE	T Géologie (S.P.C.N.).	PISOT	T Calcul des probabilités.
GAUTHERET	T Biol. végétale (P.C.B.).	ROCH (E.)	T Géologie.
LUCAS	T Recherches physiques.	SCHATZMANN	T Astrophysique.
A. THOMAS.....	T Biologie cellulaire.	TERMIER	T Paléontologie stratigra-
ARNULF	T Optique appliquée.		phique.
M. MORAND	T Physique.	ZAMANSKY	T Mathématiques génér.
SOLEILLET	T Physique.	JOLIOT	T Physique nucléaire et
FORTIER	T Mécanique expérimentale		Radioactivité.
	des fluides.	LENNUIER	T Physique (P.C.B.).
FROMAGEOT	T Chimie biologique.	RIZET	T Génétique.
DANJON	T Astronomie.	ROUTHIER	T Géologie appliquée.
LAPORTE	T Physique générale et	M ^{me} TONNELAT.....	T Théories physiques.
	Radioactivité.		Mathématiques (M.P.C.).
JANET	T Mécanique analytique et	SOUCHAY	T Chimie (P.C.B.).
	Mécanique céleste.	AIGRAIN	T Physique (P.C.B.).
PETIT	T Biologie maritime.	BRUSSET	T Chimie (P.C.B.).
QUENEY	T Météorologie et dyna-	M. LEVY.....	T Physique théorique.
	mique atmosphérique.	LENORMANT	T Physiologie.
GALLIEN	T Embryologie.	M ^{me} CHAIX.....	T Chimie biologique.
EICHORN	T Biol. végétale (P.C.B.).	M ^{me} HUREL-Py.....	T Biol. végétale (P.C.B.).
DE CUGNAC.....	T Biol. végétale (P.C.B.).	PIAUX	T Chimie (P.C.B.).
M ^{lle} CAUCHOIS.....	T Chimie physique.	BRUN	T Mécanique expérimentale
THIELLER	T Physique du globe.		des fluides.
L'HÉRITIER	T Génétique.	LEDERER'	T Chimie biologique.
GRIVET	T Radioélectricité.	M ^{me} DUBREUIL	
PONCIN	T Mécanique des fluides.	JACOTIN	T Mathématiques.
DUBREUIL	T Arithmétique et théor.	M ^{me} LELONG.....	
	des nombres.	FERRAND	T Mathématiques (E.S.N.).
QUELET	T Chimie organique.	BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.).
CAGNIARD	T Géophysique appliquée.	COTTE	T Physique (M.P.C.).
CHAMPETIER	T Chimie macromolécul.	J.-E. DUBOIS.....	T Chimie.
CUVILLIER	T Géologie structurale et	LAHOTTE	T Zoologie.
	Géologie appliquée.	LE ROLLAND.....	T Mécanique des fluides.
JUNG	T Pétrographie.	MICHEL	T Chimie (P.C.B.).
TRILLAT	T Microscopie et diff.		
	électronique.		

Secrétaire général C. MONNIER.

SÉRIE A, N° 3344

N° D'ORDRE :

4216

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences physiques

PAR

CLAUDE PÉAUD-LENOËL

PREMIÈRE THÈSE :

LA PRÉPARATION ET LE MODE D'ACTION
DE LA LEVANE-SUCRASE :
UN ENZYME DE *BACILLUS SUBTILIS*

DEUXIÈME THÈSE :

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ



Soutenues le 10 Janvier 1957 devant la Commission d'examen

M. R. WURMSER, *Président*

M. C. FROMAGEOT, *Examineur*

M^{me} P. CHAIX, *Examineur*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RENÉ WURMSER, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, qui m'a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

En témoignage de profonde reconnaissance.

A la mémoire de MONSIEUR LE PROFESSEUR CLAUDE FROMAGEOT, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, qui a suivi avec une constante bienveillance le développement de ce travail.

En témoignage de ma gratitude.

A MADAME PAULETTE CHAIX, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.

En hommage respectueux et reconnaissant.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR JACQUES TREFOUEL, Membre de l'Institut, Directeur de l'Institut Pasteur, qui m'a fait l'honneur de m'accepter parmi les disciples de la Maison de Monsieur Pasteur.

En témoignage de ma respectueuse reconnaissance.

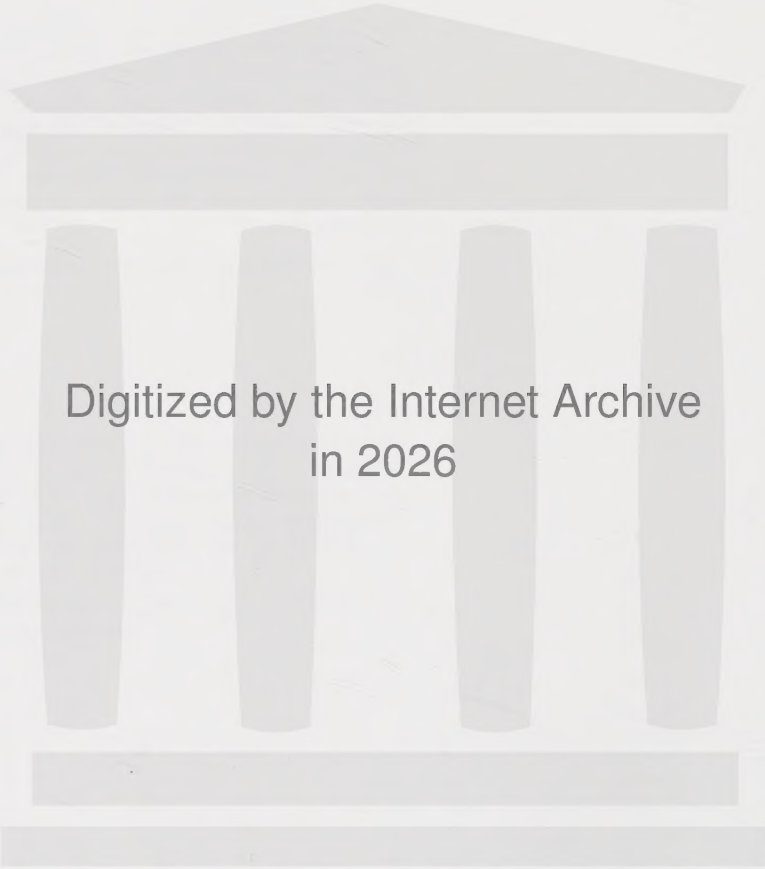
A MONSIEUR LE PROFESSEUR MAURICE LEMOIGNE, Membre de l'Institut, Chef du Service des Fermentations de l'Institut Pasteur, qui m'a accueilli dans son service, m'a constamment prodigué les encouragements et les conseils, et a mis à ma disposition tous les moyens matériels et moraux de mener à bien ce travail.

En témoignage de mes remerciements et de ma respectueuse affection.

A TOUS MES MAÎTRES ET MES CAMARADES DE L'INSTITUT PASTEUR qui ont bien voulu mettre à ma disposition produits rares et appareillages précieux nécessaires à mon travail, et qui m'ont efficacement soutenu de leurs conseils ou de leurs amicales critiques,

En témoignage de ma reconnaissance.

A MA FEMME.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

I. — HISTORIQUE

La lévane-sucrase, dont le mode d'action fait l'objet de cette étude, est un enzyme capable de catalyser la synthèse des *lévanes*, polyosides lévogyres de très haut poids moléculaire, constitués comme on le sait aujourd'hui, par des chaînes de restes D-fructofuranosyl, liés en β 2-6, et possédant des points de branchement β 2-1.

Le substrat à partir duquel peut se former le polyoside est soit le saccharose, soit certains oligosides contenant le reste fructofuranosyl et présentant avec le saccharose d'étroites affinités structurales.

Suivant la nomenclature moderne [46], la lévane-sucrase devrait être appelée lévane-saccharose- β D-fructofuranosidase. J'ai traduit en français, pour abrégier, le nom courant de *levan sucrase* proposé dans le texte anglais [78] par Hestrin et ses collaborateurs.

La lévane-sucrase a été connue par ses effets longtemps avant la découverte de l'enzyme lui-même. De tout temps en effet, les fabricants de sucre ont été gênés par la présence de sirops visqueux et filants à divers stades de leur fabrication, produits dont la présence était la cause de pertes en sucre et de difficultés considérables lors de la concentration et de la cristallisation.

Depuis plus de cinquante ans, on a reconnu que ces produits étaient d'origine bactérienne. Le plus souvent les souches incriminées produisent des dextrans, mais Glaser décrit en 1895 [59] un *Bacillus viscosusacchari*, isolé de sucreries et produisant un moût filant et opalescent qui nous paraît aujourd'hui correspondre à une souche productrice de lévane. Greigsmith et ses collaborateurs [63, 64], en 1901, montrent que *B. levaniformans* produit un polyoside formé de restes fructose, et que le saccharose ou le raffinose, à l'exclusion du glucose, du fructose, du lactose ou du maltose, sont les seuls substrats convenables à la production du

polyoside. Ils montrent que ce polyoside baptisé lévane est distinct de l'inuline. Beijerinck [15, 16, 17] confirme les résultats précédents avec des cultures de *Bacillus mesentericus vulgatus* et prépare des filtrats de ces cultures, capables de réaliser la synthèse de lévane à partir du saccharose ou du raffinose; il donne

TABLEAU I. — *Microorganismes producteurs de lévane-sucrase*

<i>Microorganismes</i>	<i>Auteurs</i>	<i>Réf.</i>
<i>Bacillus viscosusacchari</i>	Glaser	[59]
(<i>mesentericus</i> ou <i>subtilis</i> ?)		
<i>Bacillus levaniformans</i>	Greig-Smith	[63]
(<i>mesentericus</i> ?)		
<i>Bacillus mesentericus</i> vulg.	Beijerinck	[15]
	Owen	[108]
	Harrisson Tarr et Hibbert	[68]
<i>Bacillus megatherium</i>	Owen	[108]
<i>Bacillus subtilis</i>	Harrisson et coll.	[68]
<i>Bacillus polymyxa</i> NCTC 4744	Hestrin et coll.	[78]
Bacille de Oerskov (?).....	Oerskov	[106]
<i>Aerobacter levanicum</i>	Hestrin	[3]
<i>Gommobacter</i> ?	Fernbach et Schoen	[51]
<i>Streptococcus salivarius</i>	Evelyn Cooper et coll.	[28]
		[29]
» »	Hehre et coll.	[73]
<i>Streptococcus bovis</i>	Niven et coll.	[105]
<i>Leuconostoc mesenteroïdes</i> NRRL		
B 512	Hehre et Neill	[74]
	Jeanes et coll.	[86]
<i>Phytomonas pruni</i>	Lynes, Peat et Stacey	[100]
<i>Phytomonas prunicicola</i>	Palmer	[110]
<i>Phytobacterium vitrosum</i>		
Actinomycetes	Viebel	[131]
<i>Aspergillus sydowi</i> (spores)	Kopeloff et coll.	[92]

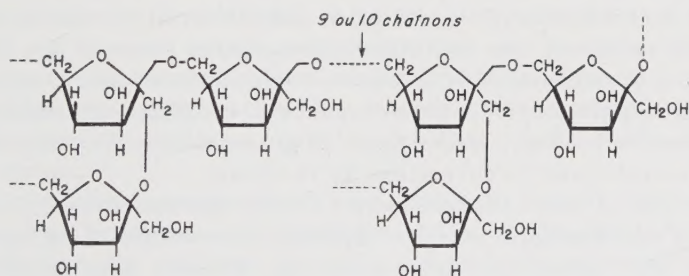
à l'enzyme responsable de cette synthèse le nom de viscosaccharase. Beijerinck [18, 19] distingue nettement les microbes producteurs de dextranes, classés dans les lactobactériacées, des producteurs de lévane du genre *bacillus*, et des producteurs (en général bactéries Gram —) de polyosides complexes, qu'il baptise cellulanes; il démontre que ces derniers peuvent synthétiser leurs polyosides à l'aide de n'importe quel ose, alors que les deux premières catégories ne forment des polyosides que sur saccharose ou raffinose. Fernbach et Schoen parviennent à des conclusions analogues [51].

D'autres auteurs ont isolé des organismes variés capables de synthétiser des lévanes de constitution très analogue à celles de *B. subtilis*. Le tableau I donne une liste de ces organismes. Notons, en particulier, que *L. mesenteroïdes* NRRL B 512 semble capable de synthétiser à la fois des lévanes et des dextranes [74, 86]. Les plantes vertes sont également capables de réaliser la synthèse de polyosides du type lévane. Rabaté [118], Challinor et ses collaborateurs [25], Laidlaw et Reid [94] et d'autres auteurs en ont trouvé dans diverses graminées et salicacées.

De nombreuses années vont s'écouler sans que le problème de la formation des lévanes fasse de progrès sensibles. Les chercheurs caractérisent alors imparfaitement les substrats et les produits de la réaction et travaillent avec des extraits impurs et non stériles.

Dans ce domaine, il faut citer les travaux d'Owen [108] en 1911, de Kopeloff et ses collaborateurs [92] en 1920, de Dienes [43, 106] en 1935.

Des précisions importantes ont été cependant apportées par la connaissance de plus en plus exacte de la structure de la lévane : une série de travaux dus à Beijerinck [16], à Hibbert et Brauns [82], à Tipson et Brauns [128], à Challinor et ses collaborateurs [25], à Bell et Dedonder [22], permettent de préciser cette structure, de montrer que le polyoside ne contient que des résidus fructosyl, dans la limite des méthodes analytiques les plus précises [22, 110], que la lévane n'est pas réductrice, que son poids moléculaire est de plusieurs millions, et finalement que sa formule développée est celle présentée ci-dessous :



La lévane purifiée est lévogyre, $\alpha_D = -40^\circ$, et forme des solutions opalescentes très visqueuses.

Tous les faits précédents concernant la structure de la lévane naturelle, produite par le microbe en culture ou non proliférant. On ne connaît pas en détail la structure de la lévane de synthèse produite par les extraits enzymatiques. Hibbert, Tipson et Brauns [83], puis Hestrin et ses collaborateurs [78] ont montré qu'elle

ne contient que du fructose et que ses propriétés physiques sont voisines de celles de la lévane naturelle. Il en est de même des propriétés immunologiques (Hehre, 1945 [73]). Il importerait cependant de reprendre l'étude de la structure du produit de la synthèse enzymatique. Cette étude est en cours dans notre laboratoire; les résultats préliminaires montrent que le produit obtenu par synthèse n'est pas essentiellement différent du produit naturel. Les résultats définitifs seront publiés dans un autre travail.

II. — PROPRIETES DES EXTRAITS ENZYMATIQUES

C'est Beijerinck [16] qui réalisa les premières expériences de synthèse de lévane par des filtrats de cultures bactériennes sans cellules. D'autres auteurs ont préparé depuis lors des extraits actifs (Owen, 1911 [108]; Kopeloff et ses collaborateurs, 1920 [92]) par broyage de cellules de divers micro-organismes. Dienes [43] montra, malgré son erreur d'interprétation sur la nature du produit de la réaction, que l'enzyme d'*Aerobacter* diffuse dans la gélose et qu'il est ainsi possible d'obtenir des fragments d'agar actifs et stériles. Harrisson et ses collaborateurs opèrent avec des cultures filtrées sur bougie Berkefeld [68].

L'étude du mécanisme de synthèse de la lévane avait été déjà beaucoup avancée à cette époque par les travaux de Hibbert et ses collaborateurs [68], qui avaient étudié la formation de lévane par *B. mesentericus* Trevisan et *B. subtilis* cultivés sur le saccharose. Ils montrent que des filtrats de cultures forment des lévanes, que seuls le raffinose et le saccharose sont actifs et que le mélézitose (3 α D-glucopyranosyl, β D-fructofuranosyl, α D-glucopyranoside [72]) le lactose, le maltose, le D-xylose, le glucose ou le fructose ne sont pas substrats pour la formation de la lévane.

Hestrin et ses collaborateurs [3, 78] obtiennent en 1942 des extraits enzymatiques stériles capables de synthétiser en quelques heures des quantités mesurables de lévane. Ces préparations extraites de *B. subtilis*, cultivé sur saccharose, ne peuvent être filtrées sur bougie sans perte d'activité, mais l'enzyme est exocellulaire et diffuse librement dans la gélose support de la culture comme l'avait déjà noté Beijerinck [19]. Ces auteurs donnent à la préparation ainsi obtenue le nom de *lévane-sucrase*.

Hestrin et ses collaborateurs découvrent également une bactérie du genre *Aerobacter* [78] produisant des lévanes en abondance par culture sur saccharose, bactérie dans laquelle l'enzyme

est endocellulaire et constitutif. En présence de chloroforme, ils obtiennent un autolysat de cette bactérie, stérile, et produisant de la lévane en présence de saccharose. Cet extrait n'a pas été purifié.

Hehre [73] prépare, en 1945, de la lévane-sucrase de *B. subtilis* par extraction au chloroforme de la culture complète et précipitation à l'alcool de l'émulsion obtenue. L'extrait est très peu actif et la présence de lévane n'est décelée après plusieurs heures que par la sensibilité d'un test sérologique.

Toutes ces préparations étaient très impures. Elles contenaient toutes une quantité importante d'azote protéique par rapport à leur activité, et presque aucune tentative de purification n'en a été faite.

Les produits de l'activité de ces préparations sont nombreux : il se forme, en particulier, à partir du saccharose, non seulement de la lévane, mais aussi des oligosides et du fructose libre [37, 78, 80] et même des dextranes dans certaines préparations de Hehre et ses collaborateurs [78]. Il est impossible de savoir ainsi si ces préparations contiennent un seul ou plusieurs enzymes distincts.

On ne peut, en outre, être sûr que ces extraits ne contiennent pas de polyosides préformés, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats d'Hestrin et collaborateurs concernant l'absence d'effet autocatalytique de la lévane sur sa propre synthèse [5, 80].

En conséquence, un des premiers objectifs de ce travail a été de purifier le plus possible l'extrait enzymatique, à la fois par rapport à l'azote, et surtout par rapport aux polyosides qui souillent ces préparations. Il m'a paru également important de m'assurer ensuite qu'aucune autre transglycosylase ne pouvait interférer dans ces extraits avec l'activité de la lévane-sucrase.

De plus, une purification des extraits pouvait seule permettre des conclusions certaines sur la structure et le mode d'action de l'enzyme.

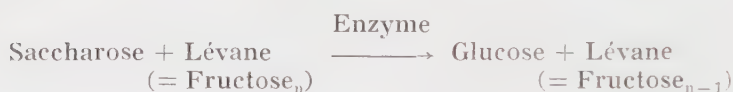
La première question qui s'est posée à l'esprit des auteurs qui se sont intéressés à la synthèse de la lévane, était de savoir à partir de quels substrats pouvait se former ce polyoside.

Beijerinck, 1910 [16], avec *B. mesentericus*, Fernbach et Schoen, en 1912 [51] avec un bacille mal déterminé, puis Harrisson et ses collaborateurs, 1930 [68], avec *B. subtilis*, ont essayé de nombreux substrats. Leurs résultats montrent que seuls le saccharose et le raffinose permettent la synthèse de la lévane, alors que tous les autres oses ou osides sont inactifs, y compris le sucre interverti. Harrisson en déduit que la structure du substrat doit être R- β -D-fructofuranoside, mais cette conclusion ne m'a pas

paru satisfaisante, car le méthyl-β-D-fructofuranidose ou l'inuline ne sont pas des substrats [5, 79], ce qui constitue une importante différence avec des enzymes voisins comme les invertases [6], ou l'inulase [37]. La différence de spécificité de ces différents enzymes m'engageait nécessairement à formuler certaines hypothèses sur le mode d'action de la lévane-sucrase et à essayer de les vérifier.

D'autre part, Owen avait montré en 1923 [109] que l'invertase de levure n'active pas la production de lévane, comme on le croyait jusqu'alors. Ce résultat, confirmé par les recherches de Harrisson et ses collaborateurs [68] prouve que la lévane ne provient pas du fructose à l'état « naissant ». Il revient à Hestrin et Avineri-Shapiro [5, 79] d'avoir pu donner, grâce à une analyse soignée des produits de la réaction, une équation globale du phénomène.

Ces auteurs montrent que l'apparition de lévane et de glucose se fait directement aux dépens du saccharose, sans interconversion aldose-cétose. Ils écrivent la réaction catalysée par la lévane-sucrase :



Ces équations permettent de classer la lévane-sucrase comme une transglycosylase, suivant la nomenclature proposée par Doudoroff, Barker et Hassid [46], la réaction générale induite par ces enzymes étant



où X est le radical glycosyl transféré, R et R' deux radicaux arbitraires (dans le cas des phosphorylases, R' est de type $A - PO_3 H_2$, dans le cas des transglycosylases pures, R' est un glycoside). Les expériences de Cohn [26], de Kalckar [88] et de Koshland et Stein [93] montrent que dans plusieurs cas, c'est bien le *glycosyl* et non le *glycoside* qui est transféré par ce groupe d'enzymes.

Les équations précédentes donnent une vue très simplifiée du phénomène. Une certaine quantité de fructose libre se forme toujours, en même temps que la lévane et le glucose, aux dépens

du saccharose, ou du raffinose, comme l'ont bien vu Hestrin et ses collaborateurs [80]. Ceci revient à dire que les préparations contiennent toutes un pouvoir d'hydrolyse dont on ne pouvait affirmer qu'il était dû à la lévane-sucrase elle-même. En particulier, dans les expériences de ces derniers auteurs, le rapport fructose libre/lévane formés varie sensiblement au cours du temps. Cependant, ils pensent que l'enzyme est responsable, à la fois de l'inversion et de la synthèse de lévane, écrivant ainsi l'équation de la réaction :



L'hypothèse contraire pouvait être soutenue, et Forsyth et Webley [56], puis Mattoon et ses collaborateurs [101] opérant avec des liquides de cultures de *Bacillus subtilis*, concluent à l'existence d'une invertase, et même peut-être, d'une lévane-sucrase hydrolysant le polyoside formé, accompagnant la lévane-sucrase.

J'avais à choisir entre ces hypothèses et là encore les résultats expérimentaux devaient donner des conclusions importantes en ce qui concerne le mode d'action du ou des enzymes en cause. Encore devais-je tenir compte de l'existence de nombreux oligosides distincts, présents, après action de la lévane-sucrase brute sur le saccharose ou le raffinose [39, 50] et examiner s'il convient d'intégrer ces produits dans les équations de Hestrin et ses collaborateurs.

L'influence des conditions physico-chimiques de la réaction sur l'activité de la lévane sucrase était encore fort mal connue, et un des buts de ce travail était de préciser d'abord ces facteurs.

Dans le cas de l'enzyme d'*Aerobacter*, étudié par Hestrin [5] le pH optimum d'activité se situe vers 5,8 et la courbe d'activité en fonction du pH est monophasique, ce qui plaide en faveur de l'unicité de l'enzyme dans les extraits.

D'autre part, le rendement de la réaction baisse rapidement quand la concentration de saccharose initial augmente, et la vitesse de réaction n'est constante qu'en dessous d'une certaine concentration de lévane, sans qu'Hestrin puisse expliquer une telle anomalie de façon satisfaisante. Lorsqu'on atteint la concentration limite (0,350 à 0,450 gramme de lévane pour cent ml), la réaction s'arrête brusquement. Cette cinétique imparfaitement définie n'a pas permis aux auteurs antérieurs le calcul de la constante de Henri et Michaelis-Menten, et c'est par conséquent un des problèmes que j'avais à résoudre.

Les mêmes auteurs n'avaient observé aucune action autoca-

talytique de la lévane sur sa propre synthèse [80], et ceci constituerait une différence importante avec l'effet initiateur des dextranes sur leur synthèse [76] ^(a), et avec le cas identique de la phosphorylase de muscle ou de levure [30, 31, 66, 67].

Là aussi, la question de la purification des extraits m'a paru importante car il n'était pas exclu que les préparations de Hestrin et ses collaborateurs n'aient pu contenir un peu de lévane indétectable avec les moyens analytiques de l'époque.

Les mêmes auteurs ont étudié la thermodynamique de la réaction de synthèse, mais ont échoué dans leurs essais de reversion de l'activité de l'enzyme suivant la formule :



Cependant, *Aerobacter* hydrolyse lentement la lévane formée, et le glucose est un inhibiteur compétitif [80], ce qui fait penser à la possibilité d'une réversibilité. En ajoutant de l'invertase au milieu en réaction, on devrait accélérer la destruction du saccharose et, par conséquent, dévier l'équilibre dans le sens 2. Sur ce point, j'avais à choisir entre les conclusions d'Hestrin [5] qui ne constate aucune variation de l'équilibre des réactions 1 et 2 et, par conséquent, admet que la réaction (1) n'est pas possible dans le sens 2, et les conclusions de Doudoroff et O'Neal [47] qui observent une augmentation de la formation de sucre réducteur en présence d'invertase et du système (1) complet, ce qui conduit à penser que la réaction (1) est bien réversible [45, 47].

Dans les deux cas, de nouvelles expériences étaient nécessaires pour aboutir à une conclusion certaine et calculer éventuellement la constante d'équilibre de la réaction (1), de manière à connaître l'énergie de liaison osidique de la lévane.

Sur la structure et le mode d'action de la lévane-sucrase, à peu près rien n'était connu : Hestrin et ses collaborateurs [80] ont étudié l'action de quelques inhibiteurs de type non compétitif : monoiodacétate, fluorure, cyanure, dont aucun n'exerçait d'effet notable; seule la phlorizine exerce un effet peu marqué (40 % d'inhibition à concentration $7 \cdot 10^{-3}$ M).

Mon attention a été attirée par un résultat remarquable de ces auteurs qui ont montré que certains oses sont des inhibiteurs compétitifs de la réaction de synthèse de lévane : parmi ceux-ci se rangent le D-glucose, le D-galactose, l' α -méthylglucoside, le

(a) Cet effet n'était pas connu lorsque ce travail fut entrepris (1954).

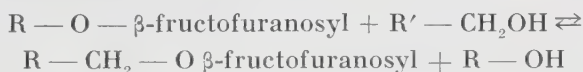
maltose, le D-xylose, le L-arabinose et le lactose. Les autres aldoses étudiés, les polyalcools comme le mannitol et le sorbitol, et les cétooses ne sont pas inhibiteurs, à l'exception du L-sorbose. Ces observations ont paru mériter une étude expérimentale conduisant à diverses explications possibles.

La formation de branches du polyoside n'a pas été abordée. On ignore si les liaisons $2 \rightarrow 1$ détectées par Challinor et ses collaborateurs [25], et Bell et Dedonder [20] sont formées par le même enzyme, ou par un facteur distinct, comme dans le cas de la synthèse de l'amylpectine. La solution de ce problème qui nécessiterait une étude complète de la structure du polyoside de synthèse enzymatique, n'a pas été abordée dans ce travail et fera l'objet d'études ultérieures du laboratoire.

III. — RAPPORTS ENTRE LA LEVANE-SUCRASE ET LES ENZYMES VOISINS

Une des objets de mon travail a été de préciser les rapports existant entre la lévane-sucrase et les enzymes qui s'en rapprochent, soit par leur mode d'action, soit par la nature des produits de leur activité. En effet, on retrouve des capacités de transfert de β -fructosyl très analogues à celles de la lévane-sucrase chez de nombreuses glucosidases.

L'invertase de levure, considérée aujourd'hui comme une β -fructofuranosidase [61, 98] peut effectuer des réactions de transfert du type suivant :



$R'-CH_2OH$ peut être un ose, ou un oside, comme l'ont montré Bacon et Edelman [9] et Blanchard et Albon [21], mais $R'-CH_2OH$ peut être aussi un alcool aliphatique secondaire (Bacon, 1953 [6], Oparine et ses collaborateurs, 1954 [107]). Dans le cas où $R-CH_2OH$ est un glucide, on obtient une série d'oligosides, allant jusqu'au penta-ose, par transferts successifs de fructosyls sur le glucide initial. Les fructosyls successifs se fixent par des liaisons $2 \rightarrow 6$ (Albon, Bell et collaborateurs, 1953 [1]). Ces produits sont alors les termes inférieurs de la série lévane. Cependant, la spécificité du transfert n'est pas absolue, des liaisons $2 \rightarrow 1$ sont possibles dans certains de ces oligosides [7, 136].

On trouve aussi chez les moisissures et les plantes supérieures des β -fructofuranosidases douées de propriétés analogues et capa-

bles de réaliser la synthèse d'osides à chaînes courtes ou l'hydrolyse du β -fructoside substrat.

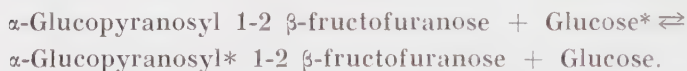
Des préparations d'*Aspergillus orizae* [49, 112], d'*Aspergillus niger* [14], de divers *Penicillium* [13, 14, 42], contiennent des enzymes de ce type; on trouve dans *Helianthus tuberosus* Lin. [10, 38, 126] et *Agave vera-cruz* Mill. [12, 123] des transfructosidases capables de réaliser la synthèse de polyosides à partir du saccharose.

Dans le cas des moisissures et des plantes vertes, la situation est plus complexe que dans le cas de l'invertase de levure: il peut exister des α -glucosidases à activité invertasique chez *A. niger* [14] et plusieurs fructofuranosidases distinctes chez *H. tuberosus* [38].

L'activité des enzymes de moisissures et de plantes paraît donner naissance, de préférence, à des oligosides ou des polyosides à liaisons 2-1 (série fructosane) plutôt qu'à des produits à liaison 2-6 (série lévane) comme c'est le cas pour l'invertase de levure. Certains oligosides formés par la lévane-sucrase sont aussi liés en 2-6 [50].

Je me suis posé la question de savoir quelle relation existait entre la synthèse de lévane par la lévane-sucrase, et la capacité de transfert des invertases. Dans les deux cas, il existe une activité hydrolysante, inséparable de l'activité de transfert de fructosyl. Dans les préparations d'invertase les plus purifiées, on n'a pas pu en effet séparer les deux activités qui paraissent bien dues au même facteur [52].

Un pas de plus dans cette analogie serait fait dans le cas où la synthèse de lévane serait effectivement réversible. En effet, Edelman [48] a montré par l'usage de glucose radioactif marqué au ^{14}C (Glucose*) que l'on a la réaction d'échange suivante en présence d'invertase de moisissure:



Edelman suppose que cette réaction se fait par l'intermédiaire d'un complexe enzyme $\sim$ fructosyl, ce qui expliquerait en même temps la formation des oligosides. Il subsiste cependant encore des difficultés dans une telle interprétation, car Whelan et Jones [134] ont obtenu en présence d'invertase de moisissure la réaction:



Or, il devrait se former du saccharose dans cette réaction, suivant l'interprétation d'Edelman, et d'autre part, le dioside (2), réducteur a été observé aussi par Bacon [7] par action de l'invertase de levure sur le saccharose. Ceci conduirait plusieurs types de complexes enzyme-fructosyl, ou plusieurs enzymes distincts.

J'ai pensé également que toute tentative pour expliquer le transfert de fructosyl par ces enzymes devait tenir le plus grand compte de ce que les uns, comme les invertases, ne pouvaient donner naissance qu'à des polymères variés, fais toujours de faible poids moléculaire, alors que les autres, comme la lévane-sucrase, ou les enzymes d'*Helianthus tuberosus* sont capables de synthèses de hauts polymères à mode de liaison bien définis, à côté de leur capacité de former des oligosides.

IV. — CONCLUSIONS

L'étude qui précède m'a fourni les bases du travail qui sera exposé dans les chapitres suivants.

1° Nous venons de voir que la faible activité et le manque de pureté des extraits enzymatiques contenant de la lévane-sucrase, ne permettaient pas une étude précise des propriétés de l'enzyme et de son mode d'action.

La première partie de ce travail exposera les recherches qui m'ont permis d'obtenir des extraits enzymatiques possédant une activité de lévane-sucrase aussi haute que possible par rapport à l'azote protéique. Ces extraits ont été en même temps débarrassés de toute trace de lévane, ce qui m'a permis d'étudier l'effet précurseur de la lévane sur sa propre synthèse.

Certaines des techniques de purification étudiées m'ont amené à des observations utiles au développement ultérieur de mon étude sur les propriétés de l'enzyme.

Dans une seconde partie, l'étude du mécanisme de la synthèse enzymatique des lévanes a été entreprise grâce aux extraits préalablement purifiés. Les conditions physico-chimiques d'activité étant mal connues, j'ai d'abord précisé l'action du pH sur l'activité de la lévane-sucrase, puis abordé l'étude de l'énergétique de la réaction par des expériences sur sa réversibilité, affirmée par certains auteurs, contestée par d'autres sur des preuves indirectes. Cette étude m'a conduit à une synthèse réversible nouvelle du saccha-

rose et de certains autres diosides analogues structuraux du saccharose.

Ces expériences m'ont été utiles pour obtenir des renseignements précis sur la spécificité et le mode d'action de l'enzyme, en même temps qu'elles m'ont fourni les résultats recherchés sur l'énergie de liaison de la lévane.

Enfin la purification des extraits enzymatiques et l'obtention d'une haute activité m'ont permis d'étudier la cinétique de la réaction. Les résultats ainsi obtenus seront exposés et discutés.

Ces expériences ont été possibles grâce à des *techniques analytiques* dont certaines m'ont été fournies par la bibliographie, mais dont d'autres ont dû faire l'objet d'une mise au point particulière; il en est ainsi d'une méthode manométrique de dosage de l'activité de la lévane-sucrase, d'un procédé nouveau d'électrophorèse de l'enzyme sur colonne de gélose, de divers perfectionnements apportés aux méthodes chromatographiques en usage, et d'un dosage de radioactivité sur les chromatogrammes.

Les résultats ainsi obtenus m'ont permis de résoudre quelques-uns des problèmes qui se sont posés au cours de cette introduction et de discuter utilement le problème particulier des relations qui peuvent exister entre le mode d'action de la lévane-sucrase et des transglycosylases qui s'en rapprochent.

Une partie de ces résultats a fait l'objet de communications aux Comptes Rendus de l'Académie des Sciences [40, 114 à 117].

CHAPITRE PREMIER

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

I. — PRODUITS EMPLOYÉS

A. — *Glucides*

Les glucides utilisés sont des produits commerciaux purs pour analyses. Ces produits ont été employés sans purification ultérieure, mais j'ai vérifié leur pureté par chromatographie sur papier.

Le saccharose radio-actif uniformément marqué par du ^{14}C nous a été fourni par le Laboratoire des Isotopes de l'Institut Pasteur. Son activité est 100 μC par mg. Il contenait moins de 1 pour 1 000 d'impuretés radio-actives après avoir été purifié par chromatographie immédiatement avant l'emploi.

B. — *Enzymes*

Invertase. — J'ai utilisé une préparation purifiée exempte de mélibiose de la Nutritional Biochemical Company, Cleveland, Ohio, U.S.A.

Glucose-oxydase. — J'ai purifié une préparation commerciale vendue sous le nom de DEEO par la C^o Takamine Laboratories, Clifton, New Jersey, U.S.A.

II. — SOUCHE ET MILIEUX DE CULTURE

La souche employée dans ce travail est *Bacillus subtilis* BG2F1. (Collection de M^{me} B. Delaporte, Laboratoire de Botanique du P.C.B., Paris). Je l'ai conservée sous forme sporulée, par dilution du milieu de sporulation à l'eau physiologique stérile, en tubes scellés, gardés à 4°. La souche ainsi conservée est restée stable.

Le milieu de croissance employée est le milieu minéral de Grelet [62] contenant du nitrate comme source d'azote et du glucose ou du saccharose, stérilisés à part, comme source de carbone. Dans toutes les expériences où la concentration du milieu en glucide n'est pas précisée, j'ai adopté la concentration 60 grammes par litre comme concentration standard.

Les cultures ont été faites en Erlenmeyers agités mécaniquement à 30°. Les spores servent à l'ensemencement d'un pied de cuve de 20 ml dans un Erlenmeyer de 150 ml. On ensemence 0,5 ml du pied de cuve en croissance exponentielle, dans 100 ml de milieu neuf, en Erlenmeyer de 1 litre.

Pour les cultures en masse, j'ai ensemencé 1 litre de culture en Erlenmeyer, en phase exponentielle, dans 10 litres de milieu neuf contenus dans un flacon de 20 litres, agitée par une turbine Rayneri type Raylu. L'aération est assurée par renouvellement à l'air stérile de l'atmosphère du flacon. Toutes les cultures ont été conduites à 30°. Dans les conditions de milieu employées, le temps de génération en phase exponentielle est de 3 h 30.

III. — METHODES ANALYTIQUES

A. — Méthodes de mesures optiques

1° *Opacité microbienne.* — L'opacité totale des cultures a été mesurée avec un photocolorimètre Coleman (Junior Spectrophotometer) dans des tubes donnant un trajet optique de 18 mm. De la densité optique mesurée à $\lambda = 650 \text{ m}\mu$, on déduit la densité optique due à la lévane, mesurée dans les mêmes conditions sur le milieu de culture après centrifugation 10 minutes à 600 g. On obtient ainsi la densité optique microbienne.

La densité optique microbienne est, pendant la phase exponentielle de la culture, proportionnelle à la matière sèche microbienne, et à l'azote protéique des bactéries, lorsque les mesures optiques donnent une valeur de la D.O. inférieure à 0,70. Dans le cas contraire, on effectue sur la culture une dilution convenable avant la lecture. On a :

$$\begin{array}{rcl} 0,10 \text{ D.O.} = & 26,9 \text{ } \mu\text{g} & \text{matière sèche} \\ & 5.10^7 & \text{bactéries} \\ & 3,8 \text{ } \mu\text{g} & \text{N protéique} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right. \text{ par ml}$$

2° Mesures de la concentration en lévane par opacimétrie. —

Les lévanes peuvent être mesurées dans les milieux de culture par leur opacité en lumière transmise. Il existe dans un tel milieu une relation linéaire entre la D.O. du milieu centrifugé et la concentration en lévane. Au spectrophotomètre Coleman type Junior, en opérant à $\lambda = 650 \text{ m}\mu$, avec un trajet optique de 1,8 cm, une densité optique de 1,00, correspond à une concentration de 30 grammes par litre de lévane naturelle. Il convient, pour établir cette relation, de tenir compte d'une correction faible due à l'opacité propre du milieu de culture centrifugé ne contenant pas de lévane; cette correction a été faite en mesurant parallèlement une culture sur glucose où ne se forme pas de lévane.

La précision de ces mesures n'est pas toujours bonne et je les ai utilisées seulement dans les stades préliminaires de ce travail, pour étudier la formation de l'enzyme dans les cultures.

B. — Dosage de l'azote protéique

L'azote protéique a été dosé dans les extraits enzymatiques par la méthode de Johnson [87] utilisant le réactif de Nessler. Les échantillons sont dialysés avant le dosage pendant trois jours, contre de l'eau distillée à 0°, avec agitation. Les échantillons dialysés sont amenés à volume connu et on prélève une partie aliquote pour le dosage.

C. — Méthode chromatographiques

1° *Chromatographie qualitative.* — L'analyse des glucides a été faite par chromatographie sur papier Whatman n° 1 ou Arches 304. Ce dernier permet la même qualité de séparation que le précédent, il est plus rapide avec la technique employée, et peut sup-

porter une plus grande quantité des produits à analyser : 1 mg environ du mélange (en poids sec).

J'ai utilisé la technique de Partridge [111], de chromatographie descendante, en rapportant le déplacement des taches à celui d'une série de glucides connus.

Le déplacement des glucides a été assuré, soit par le Butanol acide : N. Butanol 4, acide acétique glacial 1, eau 1 [111], soit par le solvant de Hough, Jones et Wadman [84] : Butanol, Ethanol, Eau (4, — 1,1 — 1,9). Les solvants ont été redistillés avant l'emploi.

La révélation a été faite par la méthode de double coloration au phthalate acide d'aniline pour la révélation des aldoses, et l'urée chlorhydrique pour la révélation des cétooses [37].

J'ai, dans certaines expériences, révélé spécifiquement les sucres réducteurs par pulvérisation du papier en chlorure de triphényl tétrazolium alcalin (TTC) suivant Wallenfels [132].

2° Chromatographie quantitative. — Je me suis inspiré de la technique d'Edelman, 1954 [48]. Les échantillons à doser sont appliqués sur papier Arches 304 avec une micropipette de 10 μ l, le volume appliqué dépend de l'ordre de grandeur des concentrations prévues par chromatographie qualitative préalable. Après développement, j'ai découpé la surface occupée par la tache, repérée par un échantillon parallèle relevé par le phthalate d'aniline ou l'urée. On met alors le papier, découpé en petits fragments, en suspension dans un tube à essai contenant 3 ml d'eau dans le cas des glucides non polymérisés, ou 3 ml d'HCl 0,05 N dans le cas des lévanes. On place les tubes bouchés à l'émeri au bain-marie à 75-80° pendant quinze minutes en agitant fréquemment, on refroidit rapidement et on mesure les différents glucides par les méthodes décrites ci-dessous, sur une partie aliquote du liquide décanté. La filtration est inutile (le résultat obtenu avec un témoin sur papier Arches 304, de même superficie (4 cm²) donne la même valeur en hexose, par les méthodes de Roë ou de Nelson), que le liquide ait été filtré ou non (2 μ g par ml environ). Il est également inutile ou même nuisible de dilacérer le papier avant le chauffage.

3° Dosage des glucides. — Le dosage des glucides dans les liquides en expérience a été fait, soit directement dans certains cas, soit après séparation par chromatographie et élution.

Le glucose ou le sucre réducteur total ont été dosés par la méthode de Nelson (104).

Le fructose, le saccharose et les polyfructosides ont été dosés par la méthode de Roë [120] modifiée suivant Cole, Hane, Jackson et Lougham [27]. Pour chaque glucide, les résultats des dosages ont

été obtenus par comparaison des valeurs colorimétriques de chaque échantillon avec une gamme témoin du glucide donné.

Lorsque les dosages sont effectués après chromatographie, il faut prendre soin d'éliminer complètement par séchage à l'étuve les traces des solvants ayant servi à l'élution, sinon les résultats sont gravement erronés par défaut.

La lévane peut être dosée comme le fructose, mais l'élution par l'eau est insuffisante, au contraire l'élution par HCl 0,05 N donne des résultats quantitatifs.

4° *Chromatographie sur colonne de charbon-célite.* — Le saccharose obtenu par synthèse en présence de lévane-sucrase a été séparé des autres glucides présents par chromatographie sur charbon-célite suivant le procédé de Whistler et Durso [135]. L'élution a été faite par un gradient de concentration d'alcool suivant Alm, Williams et Tiselius [2], comme le décrivent Bacon et Bell [8].

J'ai utilisé la célite n° 535 (Johns-Manville C° Ltd, London S.W.1) en mélange avec une partie de charbon actif (Darco G.60), (Darco D^r, Atlas Powder Cy, 60 E 42nd St., New York 17, U.S.A.). Les fractions effluentes sont recueillies sur un collecteur de fractions ERAL muni d'une tête pour liquides non conducteurs (Société Eral, 31, rue Diderot, Colombes, Seine).

On fait ensuite une chromatographie sur papier des fractions de l'effluent de manière à obtenir une analyse qualitative des glucides contenues dans chaque fraction. J'ai ainsi pu séparer les fractions contenant uniquement le saccharose.

D. — Titrage manométrique de l'activité enzymatique

1° *Théorie de la méthode.* — J'avais besoin d'une méthode rapide de détermination de l'activité enzymatique. J'ai utilisé l'oxydation du glucose libéré par l'enzyme en supposant qu'il n'existe pas d'activité invertasique distincte de celle de la lévane-sucrase dans mes extraits. Cette hypothèse émise par Hestrin et ses collaborateurs [80] s'est trouvée confirmée par la suite de mes expériences. Les équations de la réaction s'écrivent ainsi :

En présence de lévane-sucrase :

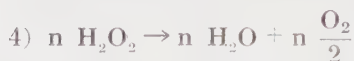
1) $n \text{ Saccharose} \rightarrow n \text{ Glucose} + n \text{ Fructosyl.}$

2) $n \text{ Fructosyl} + \text{accepteur} \rightarrow n \text{ Fructosyl-accepteur.}$

En présence de glucose-oxydase :



En présence de catalase :



On mesure l'oxygène consommé dans la somme des réactions 3 et 4 par la méthode de Warburg. J'ai opéré en présence d'un excès de saccharose de façon à ce que la lévane-sucrase soit le facteur limitant des réactions 1 à 4.

J'ai opéré aussi avec un large excès de glucose-oxydase de façon

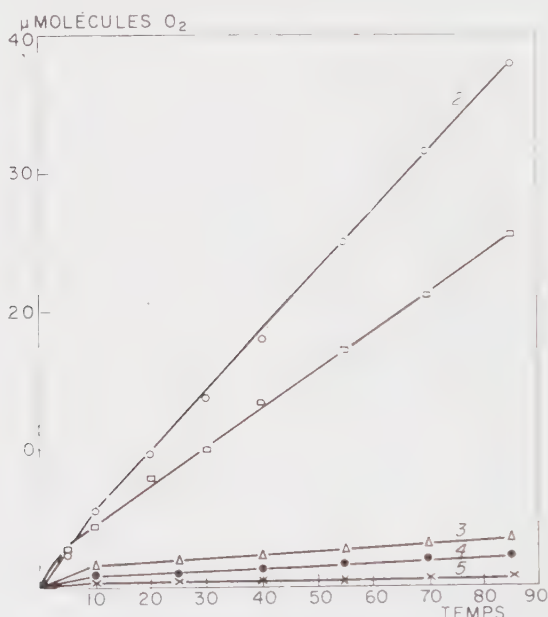


FIGURE 1. — *Activité enzymatique des cellules et du milieu de culture.*

Courbe 1 : Milieu de culture sans cellules. (130 $\mu\text{g N}$ par ml.)

Courbe 2 : Suspension microbienne lavée, 4,05 mg secs/ml (580 $\mu\text{g N}$).

Courbe 3 : Milieu de culture chauffé 10 min à 100°.

Courbe 4 : Suspension microbienne chauffée 10 min à 100°.

Courbe 5 : suspension microbienne lavée (milieu sans saccharose).

Conditions expérimentales :

Glucose oxydase 0,2 ml contenant 3,8 unités d'enzyme. — Azoture de sodium 0,2 m Mol. — Saccharose 0,35 M (sauf dans l'expérience 5). — Tampon phosphate pH 6,5 0,04 M. Liquide de culture ou suspension microbienne 1 ml. — Volume total 2,5 ml. — Atmosphère air. $t = 37^\circ$.

Abscisses : temps en minutes.

Ordonnées : $\mu\text{Mol. O}_2$ Absorbés ou $\mu\text{Mol fructosyl transféré}$ (unités L. S.).

à ce que le glucose soit toujours présent en quantité négligeable dans le système. Malgré cela, on observe toujours un temps de latence jusqu'à la saturation du système 3.

La réaction se poursuit ensuite linéairement et la pente des droites obtenues en portant la quantité d'oxygène absorbée en fonction du temps, est proportionnelle à la concentration en lévane-sucrase.

Lorsqu'on opère avec des bactéries entières, on ajoute de l'azoture de sodium à concentration suffisante pour inhiber totalement, sur un témoin, l'absorption d'oxygène due à la respiration. La catalase contenue dans le système glucose-oxydase est alors inhibée. La réaction 4 n'a pas lieu. On obtient ainsi les équations suivantes :

Réactions avec azoture de sodium :

1 μ Mol. fructosyl transféré = 22,4 μ l O₂ asorbé.

Sans azoture de sodium :

1 μ Mol. fructosyl transféré = 11,2 μ l O₂ absorbé.

2° *Purification de la glucose-oxydase « DEEO »*. — Le système oxydasique commercial DEEO contient de l'invertase qui gêne la mesure suivant les équations précédentes. J'ai éliminé l'invertase en purifiant partiellement la glucose-oxydase suivant les deux premiers stades de la méthode de Coulthard et ses collaborateurs [36].

3° *Mode opératoire*. — Dans la cupule de Warburg nous plaçons :

Extrait convenablement dilué.....	0,1 ml ou 0,2 ml
Glucose-oxydase	0,1 ml (2 U)
Tampon phosphate 0,2 M, pH 6,2.....	1 ml
Azoture de Sodium 10 ⁻² M.....	0,3 ml
Saccharose 1,75 M (tubulure latérale)....	0,4 ml
Volume total (H ² O).....	2,5 ml

On équilibre dix minutes à 37° et on bascule le saccharose. L'oxygène absorbé est calculé par différence avec un témoin contenant le système complet sans lévane-sucrase. D'après la figure 1, on voit que les lectures doivent être faites après équilibration du système dans la zone linéaire (40 à 70 minutes). Cette méthode permet de définir l'activité de la préparation enzymatique comme le

nombre de micromolécules de fructosyl transféré par minute en présence de saccharose, à 37°, pH 6,2 (fig. 1).

La pureté d'une telle préparation sera l'activité par mg d'azote protéique dans la préparation.

E. — Détermination et dosage des glucides radioactifs

1° *Théorie des méthodes employées.* — Les méthodes employées reposent sur les observations suivantes : un glucide radioactif déplaçable par chromatographie sur papier peut être révélé sur un

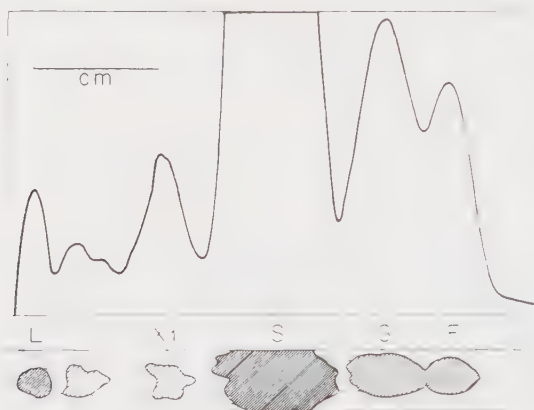


FIGURE 2. — Radio-autogramme d'un chromatogramme et enregistrement photométrique correspondant

L : tache de lévane (immobile). — X_1 : trisaccharides. — S : saccharose. — G : glucose. — F : fructose.

La figure correspond à l'action de la lévane-sucrase pendant trois minutes sur un mélange contenant :

saccharose	20 %	(poids/volume)
lévane	3 %	id

Au temps zéro on observe seulement S.

Le saccharose n'a pas été dosé dans cette expérience.

Le noircissement du radio-autogramme a été poussé volontairement, afin de laisser apparaître les taches L, X_1 , G, F, dont la somme représente environ 7 % de la radioactivité totale déposée sur le papier.

film radiographique par autoradiographie. L'image photographique ainsi obtenue, placée dans un colorimètre enregistreur d'extinction Zeiss (C. Zeiss, Ober Kochun, Wuert, Allemagne de l'Ouest) donne un enregistrement suivant une courbe d'extinction dont la planimétrie donne la surface (fig. 2).

J'ai porté sur le graphique de la figure 3 :

a) La surface des courbes d'extinction, mesurée en fonction de la radioactivité sur chaque tache chromatographique (courbe 1).

On voit sur la figure que cette surface est proportionnelle à la radioactivité, à condition que la radioactivité ne soit pas trop faible.

b) La surface des courbes d'extinction, en fonction du déplacement de la tache sur le chromatogramme, à valeur constante de la

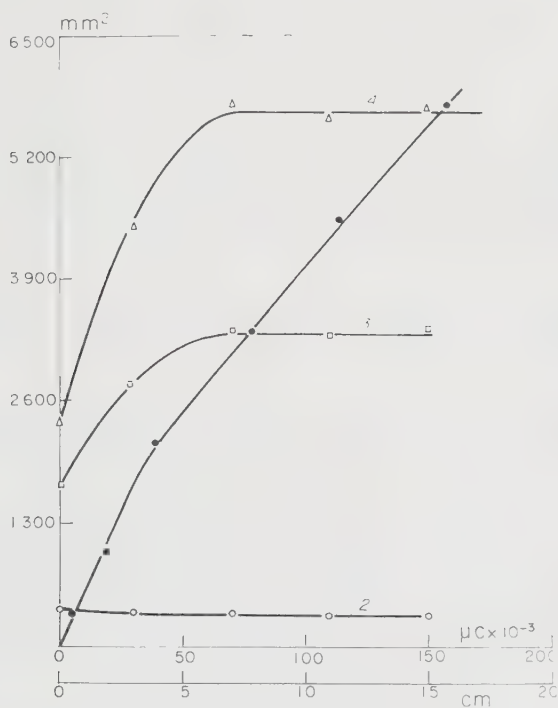


FIGURE 3. — Etalonnage de la mesure planimétrique de la radioactivité

Conditions expérimentales : On opère par chromatographie de taches de saccharose radioactif. Radioactivité $2 \mu\text{C}$ par mg.

Solvant Butanol-Ethanol-Eau (4, 1,1, 1,9). — Radio-autogrammes de 96 heures. — Enregistrement photométrique et mesure planimétrique des courbes enregistrées. — (Photoenregistreur C. Zeiss).

Ordonnées : Surface de la courbe d'extinction en mm^2 .

Courbe 1 : Radioactivité croissante déposée sur le chromatogramme :

Abscisses : Radioactivité.

Courbes 2, 3, 4 : Radioactivité constante, mesures planimétriques en fonction de la distance parcourue sur le chromatogramme (portée en abscisse).

Courbe 2 : tache de $5 \cdot 10^{-2} \mu\text{C}$.

Courbe 3 : tache de $78 \cdot 10^{-2} \mu\text{C}$.

Courbe 4 : tache de $156 \cdot 10^{-2} \mu\text{C}$.

radioactivité (courbes 2, 3, 4). La surface est constante, à condition que le produit radioactif déposé sur la tache de départ puisse se répartir sur le papier conformément aux lois de la diffusion, ce qui nécessite un déplacement minimum de 4 à 5 cm dans le cas des glucides.

Les résultats sont reproductibles avec une précision de 5 %, à condition d'opérer avec les précautions suivantes :

- 1) déplacer la tache de 40 mm au moins sur le chromatogramme;
- 2) opérer toujours avec le même papier et le même solvant chromatographique;
- 3) utiliser des temps de pose bien constants, dans des conditions de géométrie reproductibles. Les temps de pose doivent être calculés de façon à ce que le noircissement sur le film ne soit jamais qu'une fraction faible du noircissement maximum possible en un point donné de l'émulsion photographique;
- 4) opérer l'enregistrement photométrique sur toute la largeur de la tache. On obtient ainsi une intégration automatique de l'extinction totale.

On peut aussi mesurer la radioactivité d'un grand nombre de taches peu actives, en un temps court, en comparant la surface de la courbe d'extinction avec les surfaces témoins de radioactivité connue, mesurées dans les mêmes conditions.

Dans le cas des produits non déplaçables sur le chromatogramme, en particulier des lévanes, la méthode ne s'applique pas : la surface de la courbe d'extinction donne une valeur trop faible de la radioactivité du produit. Nous avons alors mesuré la radioactivité directement sur le papier chromatographique par la méthode d'Edelman [48] avec les précautions suivantes :

- a) Les taches initiales ont un diamètre égal ou inférieur à 8 mm.
- b) Les deux faces du papier sont comptées successivement et on fait la moyenne des deux comptages (Il y a une différence notable entre les deux, dans le cas de très hauts polymères qui ne traversent pas complètement le papier).
- c) Opérer les comptages dans des conditions de géométrie bien constante.

2° *Techniques.* — La mesure photométrique de la radioactivité comporte quatre stades :

- a) Les produits sont chromatographiés sur une feuille de papier

Whatman n° 1, la tache initiale ayant un diamètre inférieur ou égal à 8 mm.

On chromatographie pendant quarante heures sur butanol-éthanol-eau (4/1, 1/1,9). Des témoins contenant des doses variables et connues de saccharose radioactifs sont chromatographiés en même temps et dans les mêmes conditions.

b) Les chromatogrammes bien séchés à l'étuve à 100° sont placés quatre-vingt-seize heures au contact avec des films radiographiques Kodak provenant d'un même lot de fabrication. Les autogrammes sont placés sous presse pendant l'irradiation et développés tous en même temps dans le même bain révélateur et fixateur.

c) Les radio-autogrammes (fig. 2) sont découpés en bandes de 2,5 cm de largeur, leur longueur suivant la direction de l'écoulement chromatographique. On obtient ainsi sur une même bande toute la série des taches correspondant aux glucides d'un même mélange initial.

d) Chaque bande est placée dans le photocolorimètre enregistreur Zeiss. La mesure est faite avec une fente de 20 mm de largeur, en lumière verte : $\lambda = 520 \text{ m}\mu$. On obtient ainsi une courbe (fig. 2) dont les différentes portions correspondent à chaque glucide et on mesure au planimètre la surface comprise entre la base, la courbe, et les deux ordonnées passant par les minima entre deux pics.

On compare ces surfaces avec le graphique obtenu par la mesure des taches de saccharose témoin de radioactivité calculée.

Les taches non déplacées sur le chromatogramme, taches correspondant au polyoside, sont découpées suivant un carré de $4 \times 4 \text{ cm}$ dont la tache forme le centre. Le papier est placé dans un châssis de plomb muni d'une fenêtre de 10 mm, placé à 2 mm de la fenêtre d'un compteur de Geiger-Mueller à fenêtre mince (General Electric C° EHM2). Les comptages sont faits au compteur intégrateur (C.E.A./CH) sur au moins mille impulsions. La radioactivité exprimée dans nos expériences en impulsions par minute, est calculée en tenant compte du temps mort du compteur, et en faisant la moyenne des mesures sur les deux faces du papier selon Edelman [48]. Dans les conditions géométriques expérimentales, $1 \mu\text{C} = 47\,000$ impulsions par minute (tache de $\varnothing = 8 \text{ mm}$, papier Whatman n° 1).

Les variations d'épaisseur du papier n'introduisent que des erreurs faibles [48], il n'en a pas été tenu compte dans nos calculs.

F. — *Electrophorèse en gélose*

L'étude de la mobilité électrophorétique de l'enzyme a été faite par la méthode de Gordon et ses collaborateurs [60] sur plaque de gélose.

La gélose utilisée est purifiée selon Coté [35], mise en solution à 15 pour mille, puis étalée sur une place de verre de 180×60 mm. On assure une bonne adhérence de la gélose au verre en enduisant au préalable la plaque d'une mince couche de gélose liquide qu'on sèche à l'étuve [23]. Les électrophorèses ont été faites en tampon acétate $\mu = 0,05$ pour les pH 4,1 et 4,5 et en tampon phosphate $\mu = 0,05$ à pH 6,0. Les tampons acétate sont mélangés avec la gélose, à double concentration, à 45°, juste avant l'emploi pour éviter l'hydrolyse partielle de la gélose.

Les extraits enzymatiques ont été placés dans une cuve creusée dans la gélose, de 25 mm de longueur $\times$ 2 mm de largeur, perpendiculaire à la grande dimension de la plaque, et placée à 90 mm du bord de la plaque. L'extrait amené au pH de l'expérience est mélangé avant l'emploi avec de la gélose à double concentration à 45°. Les expériences sont conduites sous une tension de 6 volts par cm, pendant cent-vingt à cent-cinquante minutes. On opère à la chambre froide à 0°. Le courant d'électro-osmose est repéré grâce à une cuve témoin contenant une solution de glucose à 2 % dans de la gélose [23], et placée sur la même abscisse de départ. L'emplacement du glucose en fin d'expérience est révélé en faisant une empreinte de la plaque, sur papier Whatman n° 1, et en révélant le sucre réducteur par la technique de Wallenfels au T.T.C. [132]. On obtient ainsi le point neutre.

La position du pic d'activité enzymatique est révélée par deux méthodes.

1° On découpe dans le sens de la longueur une bande de gélose de 10 mm de largeur, qu'on partage ensuite perpendiculairement en parallépipèdes de $3 \times 3 \times 10$ mm. Ces parallépipèdes sont mis en incubation une heure à 37° en présence de saccharose à 10 % en tampon 0,2 M, pH 6,2. On dose ensuite le sucre réducteur formé par la méthode de Nelson [104] sur des prélèvements de 0,05 ml de chacun des tests.

2° On relève l'activité enzymatique directement en pulvérisant à la surface de la plaque de gélose une solution de saccharose à 60 % (poids/volume). Le pH de la réaction est ajusté en réglant de façon adéquate le pH du tampon phosphate 0,2 M dans lequel on dissout le saccharose. Après une heure d'incubation à 37° à

l'étuve (atmosphère sèche), on exécute une réplique de la plaque sur papier Whatman n° 1 qu'on révèle par la technique de Wal-lenfels. Cette technique peut être utilisée directement sur la gélose, mais la diffusion des réactifs rend l'image trop floue.

L'activité est repérée par une coloration rouge sur le papier ou la gélose. J'ai évité d'employer un excès des réactifs (saccharose et T.T.C. alcalin) ou d'opérer l'incubation en atmosphère humide, sinon la diffusion rend les résultats peu lisibles.

3° Après quelques heures d'incubation, on observe dans les tubes contenant les tests obtenus avec les parallépipèdes découpés dans la plaque, l'opalescence caractéristique de la formation de lévane.

J'ai vérifié par chromatographie sur papier que cette opalescence est bien due à l'existence abondante de lévane.

On observe de même une opalescence sur la gélose de la plaque pulvérisée avec la solution de saccharose, mais l'image est moins bonne car la lévane formée donne des structures granulaires déjà signalées par d'autres auteurs [43].

CHAPITRE II

EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA LÉVANE-SUCRASE

I. — PRODUCTION DE L'ENZYME

Pour obtenir des préparations aussi riches que possible en activité enzymatique, nous avons étudié d'abord les conditions de formation de l'enzyme dans les cultures de *Bacillus subtilis*. Il fallait établir d'abord si :

1° La production de l'enzyme était liée à certaines phases de la croissance.

2° Cette production d'enzyme était inductible dans la souche du laboratoire, comme dans celle étudiée précédemment par Hestrin et ses collaborateurs [3, 78], ou si elle était constitutive, et dans le premier cas, si la production d'enzyme était liée à la présence constante de saccharose dans le milieu.

3° Certains produits du métabolisme, et particulièrement le glucose, connu comme inhibiteur de la synthèse de lévane [80], étaient inhibiteurs de la synthèse de l'enzyme.

Les résultats obtenus [40, 116] nous avaient permis de constater que :

1° Conformément aux données précédentes, il ne se forme pas d'enzyme par culture de *Bacillus subtilis* BG2 Fl sur glucose.

2° En phase exponentielle, et en présence de saccharose inducteur, l'activité relative de la culture reste sensiblement constante.

Lorsque l'inducteur a disparu, c'est l'activité totale de la culture qui reste constante.

3° La concentration du saccharose, pourvu qu'elle soit suffisante, n'influe pas sur la production de l'enzyme.

4° La présence de glucose dans le milieu de culture inhibe fortement la synthèse du polyoside, mais reste sans influence sur la synthèse de l'enzyme.

La préparation des extraits a donc, en conséquence, été entreprise sur des cultures en phase exponentielle, suffisamment jeunes pour que le saccharose, employé comme substrat carboné, n'ait pas été entièrement épuisé par l'activité enzymatique de la culture.

II. — PREPARATION D'EXTRAITS ENZYMATIQUES A PARTIR DES CELLULES BACTERIENNES

D'après les expériences d'Hestrin et ses collaborateurs [3, 78], il ne semblait pas que l'enzyme soit exocellulaire. J'ai donc préparé d'abord des extraits enzymatiques à partir de cellules bactériennes, de plusieurs manières successivement.

Bien que ces préparations m'aient donné des résultats encourageants, je ne les ai pas retenues à titre de méthodes définitive et je ne les décrirai pas ici en détail, me contentant de souligner les points sur lesquels ces préparations ont apporté une contribution au problème de purification de l'enzyme.

Les cellules bactériennes obtenues suivant les techniques décrites au chapitre précédent, peuvent être, après lavage, désintégrées au broyeur de Mickles, en trente minutes à 0°, pH 6,4, en tampon de phosphate 6,6 10^{-3} M. La fraction active se retrouve, après centrifugation rapide, dans le surnageant, ou dans les particules les plus fines qui sédimentent avec la lévane à 25.000 g en trente minutes.

A partir de ces extraits bruts, ou d'extraits analogues obtenus par autolyse des bactéries, on peut précipiter l'activité par le sulfate d'ammonium, au même pH, entre 66 et 80 % de la saturation. Ces précipités remis en solution peuvent être dialysés contre le même tampon de phosphate, pendant vingt-quatre heures à 0°, sans perte d'activité notable.

L'activité contenue dans une fraction sédimentable avec la lévane, à haute vitesse de centrifugation, donne des produits plus riches en lévane et plus pauvres en fructose que la fraction de

l'activité contenue dans le surnageant. Cette observation, nous le verrons, n'est pas une preuve de l'hétérogénéité de l'enzyme, mais doit être liée à la démonstration de l'effet précurseur de la lévane qui contamine la fraction sédimentable.

Enfin la faible activité observée dans les bactéries ne rend pas compte totalement de la formation extrêmement rapide de lévane en culture.

III. — PREPARATIONS D'EXTRAITS ENZYMATIQUES A PARTIR DES LIQUIDES DE CULTURE DE *B. subtilis*

En fonction des observations précédentes j'ai examiné quelle était l'activité des liquides de culture débarrassés des microbes qu'ils contenaient par une centrifugation appropriée.

Cette expérience ne pouvait se faire que par la méthode manométrique parce que la concentration importante de lévane dans le milieu de culture gêne le dosage direct du polyoside formé.

Les microbes de 1 litre de culture sont éliminés dans une supercentrifugeuse Sharples, à 30.000 tours/minute, par deux passages successifs avec l'embouchure de 2,4 mm. Les microbes forment un culot sec dans le bol, mais la lévane reste en suspension dans l'effluent. Le liquide de culture est alors dialysé vingt-quatre heures à 4° contre du tampon phosphate 10^{-2} M pH 6,5. L'activité du liquide dialysé est mesurée par la méthode manométrique à la glucose oxydase. On suit l'absorption d'oxygène pendant quatre-vingt-dix minutes (fig. 1).

On trouve ainsi que le liquide de culture contient 0,25 unité de lévane-sucrase par ml. Les microbes correspondant à ce volume de milieu ont une activité de 0,19 unité.

A. — *Essais de fractionnement enzymatique, par adsorption sur colonne d'Hyflo-Super-Sel (*)*

Le liquide de culture obtenu comme il vient d'être décrit, peut être filtré sur une colonne d'*Hyflo-Super-Cel*. A pH légèrement acide, obtenu par addition d'acide citrique 5 N, jusqu'à pH 4,2 au liquide de culture, toute l'activité est alors retenue sur la colonne, alors que les glucides et les sels minéraux se retrouvent dans l'effluent.

Je décrirais dans l'expérience suivante l'élution de l'activité par un gradient de pH, élution dont les résultats ont été positifs.

Une culture de vingt-quatre heures (D.O. bactérienne 1,80; D.O. de la lévane formée 1,20) est centrifugée deux fois à la centrifugeuse Sharples. Le liquide de culture débarrassé des bactéries est acidifié à pH 4,2 par de l'acide citrique 0,1 M et filtré à travers une colonne d'Hyflo-Super-Cel (H = 20 cm, D = 6 cm), déposé dans une colonne de verre pyrex, à l'état de pâte dans du tampon

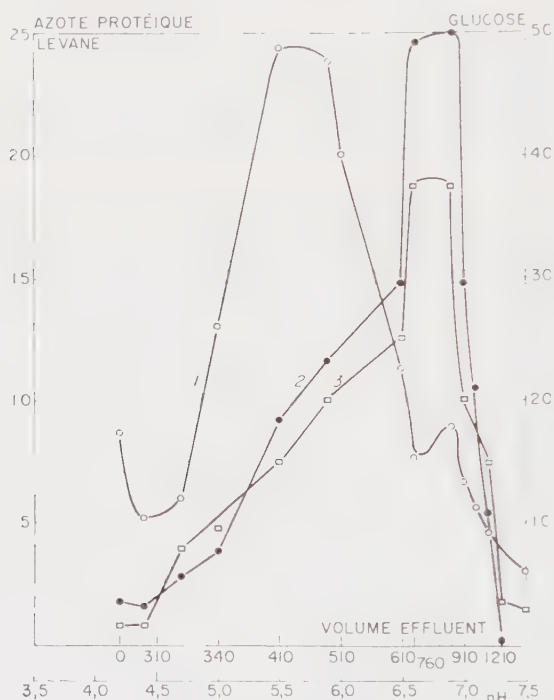


FIGURE 4. — Elution de lévane-sucrase par un gradient de pH

Conditions expérimentales :

Dosage d'Azote : μg par ml : Méthode de Nessler.

Dosage de Lévane : Prélèvements aux temps Zéro et quarante heures du mélange en réaction en présence de CHCl_3 : Extrait 1,0 ml, Saccharose 0,35 M. Volume total 1,2 ml. Tampon Mc Ilvaine, pH 6,2 0,1 M. Chromatographie sur papier Arches 304. Solvant Butanol A.acétique, eau (4/1/1), la concentration de lévane au temps Zéro est toujours nulle.

Dosage de glucose : Les prélèvements et l'incubation sont faits comme pour la lévane, l'éluion est faite sur la même feuille chromatographique.

Courbe 1. — Azote protéique (μg par ml).

Ordonnées : (Echelle de droite).

Courbe 2. — Lévane (mg par ml).

Ordonnées : (Echelle de gauche).

Courbe 3. — Glucose (mg par ml).

Ordonnées : (Echelle de gauche).

Abscisses : Volume de l'effluent (échelle supérieure) pH de l'effluent (échelle inférieure).

citrate phosphate de Mc Ilvaine, pH 4,2. On rince la colonne par le même tampon jusqu'à ce que l'effluent ne contienne plus de lévane. On réalise un gradient de pH à l'aide de la technique de Alm, Williams et Tiselius [2] au moyen de deux réservoirs superposés, le réservoir inférieur contenant du tampon de Mc Ilvaine identique à celui de la colonne et le réservoir supérieur du phosphate disodique 0,1 M. L'homogénéité du liquide du réservoir inférieur est réalisée par un agitateur magnétique. On met alors en communication le réservoir inférieur avec le haut de la colonne d'Hyflo-Super-Cel, et on règle la vitesse d'écoulement par la charge sur la colonne. Le liquide percolé est recueilli sur un collecteur de fractions par fractions de 10 ml. On recueille 161 fractions jusqu'à pH 7,60). Chaque fraction est ramenée à pH 6,5 par de la soude ou de l'acide chlorydrique et on teste l'activité de chaque dixième fraction par chromatographie qualitative et quantitative des glucides, après incubation avec du saccharose (fig. 4).

L'expérience précédente conduisait à un début de purification intéressant, les fractions 71 à 81 contenaient environ 12 Unités L.S. par ml (extrait brut 0,50 Unité), soit une concentration de 24 x et une purification de 390 x. Malheureusement, je n'ai pas pu répéter l'expérience précédente d'une manière satisfaisante; bien que j'aie étudié systématiquement chacun des facteurs de l'élution, je n'ai jamais retrouvé dans l'effluent qu'une activité très faible ou nulle. J'ai cependant cité cette expérience car elle montre que, dans les conditions expérimentales utilisées, le rapport entre les quantités de lévane et de glucose formés varie très peu, ce qui est en faveur de l'existence d'un seul enzyme dans le liquide de culture. Il n'y a pas de pic d'activité invertasique, distinct de l'activité synthétisante.

Les effluents de l'expérience précédente ont été utilisés pour des expériences préliminaires de purification par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, expériences qui ont trouvé leur suite dans la préparation définitive que j'ai adoptée.

B. Purification de la lévane-sucrase (méthode définitive)

La méthode de purification adoptée comprend trois stades :

- a) Centrifugation à haute vitesse du milieu de culture;
- b) Fractionnement par le sulfate d'ammonium entre 65 et 85 % de la saturation;
- c) Electrophorèse sur colonne de gélose.

a) *Premier stade.* — Il repose sur les observations suivantes : l'enzyme fractionné par un gradient de pH sur la colonne d'Hyflo-Super-Cel ne peut être centrifugé en une heure à 18.000 g. Il n'est donc pas particulaire. Mais les expériences d'isolement à partir des bactéries m'avaient montré que lorsque l'activité est centrifugeable à grande vitesse, elle est toujours accompagnée de la présence de lévane en plus ou moins grande quantité. On pouvait alors faire deux hypothèses : ou bien l'activité était liée à l'existence de lévane précurseur comme dans le cas de la phosphorylase [30, 67], ou bien l'activité se trouvait adsorbée sur le polyoside par une liaison physique ou chimique. Dans le cas des fractions actives éluées de l'Hyflo-Super-Cel, il n'y a aucune trace de lévane initiale décelable, ce qui conduisait à penser que la seconde hypothèse était la bonne. En effet, en centrifugeant à haute vitesse le liquide de culture, on peut récupérer 51 % de l'activité totale dans 2,5 % du volume initial. Dans la portion centrifugée contenant l'activité, on trouve 65 % de la lévane totale contenue dans le volume initial. Ceci montre que l'enzyme se trouve dans la culture lié par une forte affinité au polyoside substrat. J'ai donc conduit le premier stade de la purification comme suit :

1° On prépare dix litres de culture de *B. subtilis* BG2 F1 dans le milieu minéral habituel, en présence de saccharose. On récolte la culture lorsque la densité optique microbienne atteint 2,0 environ. Les bactéries sont séparées dans le bol d'une supercentrifugeuse Sharples à 30.000 tours/minute avec l'embouchure de 2,5 mm.

2° L'effluent opalescent contient toute la lévane (fraction Eb) qu'on sépare par de nouvelles centrifugations avec le même appareillage à 30.000 T.P.M. avec une embouchure de 0,5 mm. Après 5 passages, 65 % de la lévane est recueillie dans le culot. On remet ce culot semi-solide en suspension dans 1 000 ml de tampon phosphate 10^{-2} M, pH 6,5; on centrifuge à basse vitesse pour éliminer un petit culot bactérien ayant échappé à la première centrifugation et on dialyse avec agitation rapide le surnageant vingt-quatre heures à 0° contre le même tampon, changé fréquemment. On obtient ainsi une suspension de lévane (E L) contenant environ la moitié de l'activité totale dans Eb (tableau II).

b) *Deuxième stade de purification.* — L'activité enzymatique peut être séparée par précipitation au sulfate d'ammonium, le maximum se trouvant entre 75 et 80 % de la saturation, à 0°, pH 4,5 (fig. 5). Mes préparations ont été faites en précipitant d'abord le matériel actif par le sulfate d'ammonium saturé à pH 4,5, à 0°.

5 à 10 % seulement de l'activité se retrouvent dans le culot de centrifugation qu'on reprend par du tampon phosphate 10^{-2} M, pH 6,5. La solution protéique ainsi obtenue contient encore très peu de lévane. On précipite des fractions inactives ou peu actives successivement à 30 %, puis 50 %, puis 65 % de la saturation de

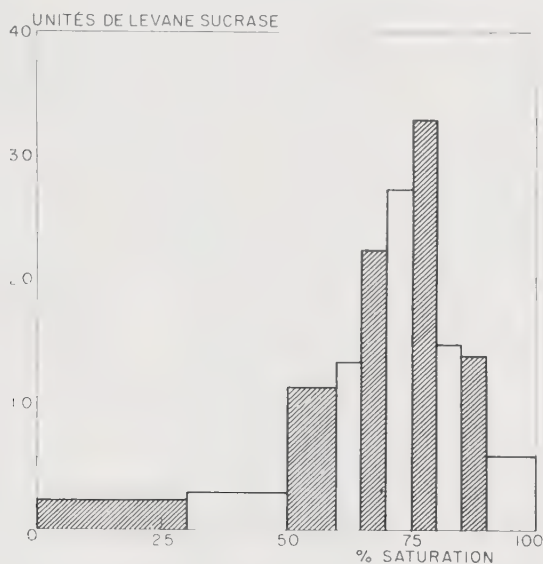


FIGURE 5. — *Fractionnement de l'extrait enzymatique par le sulfate d'ammonium*

Répartition de l'activité par précipitation au sulfate d'ammonium à 0°; pH 6,5; d'un extrait contenant 52 Unités L.S.

Volume initial 76 ml.

Volume de chaque fraction 10 ml.

Abcisses : % saturation de Sulfate d'Ammonium

Ordnnées : Activité en Unités L.S. : μ Mol. fructosyl transférées par minute.

sulfate d'ammonium à 0°, pH 4,5. Les culots de centrifugation (vingt minutes à 7 000 g) ainsi obtenus sont éliminés. On précipite ensuite la fraction active entre 65 et 85 % de saturation. On laisse reposer douze heures à 0°, on centrifuge vingt minutes à 7 000 g, on lave 2 fois par 0,2 volume de sulfate d'ammonium à 85 % de saturation à 0°, pH 4,5 et on élimine les surnageants.

L'extrait purifié formant le culot est repris par du tampon de phosphate 10^{-2} M, pH 6,5 (tableau II).

c) *Troisième stade : purification par électrophorèse.* — J'ai étudié d'abord la mobilité électrophorétique de l'enzyme, par migration sur plaque de gélose, décrite au chapitre I. La distribution de

l'activité après électrophorèse peut être étudiée qualitativement par la méthode des répliques sur papier. La plaque de gélose est mise en incubation en présence de saccharose. On observe, sur la réplique, après l'incubation, la présence d'une seule bande fortement réductrice. Cette bande est également celle où se forme de la lévane, visible sur la plaque de gélose (fig. 7).



FIGURE 6. — Analyse électrophorétique de l'extrait enzymatique.

Conditions expérimentales : Electrophorèse sur gélose de l'extrait précipité entre 65 et 85 % de la saturation en sulfate d'ammonium. Quantité d'enzyme dans la cuve initiale : 40 litres contenant 0,16 unité, N protéique 5,5 μ g par cm de la longueur de la cuve. Densité de courant : 6 volts/cm.

Courbe 1. — pH 6,0, durée 2 h 30, force ionique $\mu = 0,05$. Incubation des fractions 2 h 30 à 37°. T_1 cuve initiale.

Courbe 2. — pH 4,5, durée 2 h 15, force ionique $\mu = 0,05$. Incubation des fractions 2 h à 37°. T_2 cuve initiale.

Courbe 3. — pH 4,1, durée 4 h 20, force ionique $\mu = 0,05$. Incubation des fractions 2 h à 37°. T_3 cuve initiale.

Abscisses : Déplacement électrophorétique à partir du point neutre en millimètres.

Les zones hachurées donnent la position des cuves initiales.

Ordonnées : Milligrammes de sucre réducteur formés par incubation à 37° avec parallélipède de gélose : Volume 90 ν l. Saccharose à 10 %, pH 6,2. 1 000 μ l.

N. B. — Les activités restant adsorbées dans la cuve initiale n'ont pas été portées sur les courbes. Il reste de 5 à 20 % de l'activité non mobile.

A pH acide (pH 4,1 et 4,5), il n'y a pas de traînée entre la tache initiale et le pic d'activité (fig. 6); à pH 6,2, il existe une traînée.

Si on suppose que cette traînée est due à une hétérogénéité de la protéine enzyme ou à l'adsorption spécifique de molécules de lévane de poids moléculaire variable modifiant la mobilité électro-

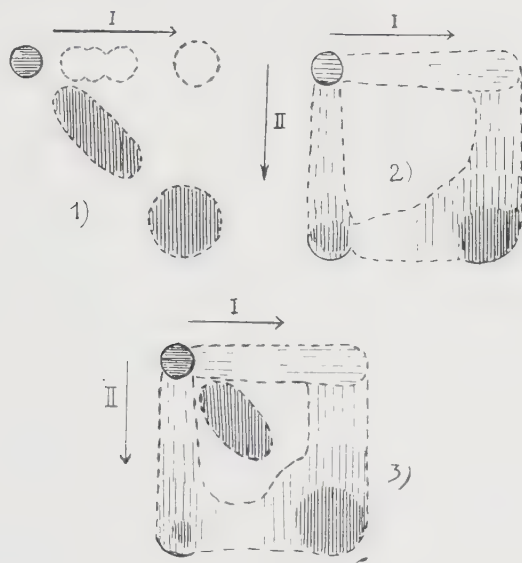


FIGURE 7. — *Electrophorèse à deux dimensions de l'extrait enzymatique.*

Electrophorèse sur plaque de gélose. Migration dans le sens des flèches, en tampon phosphate $\mu = 0,05$, pH 6,2, durant 2 h, dans chaque dimension, densité de courant : 6 volts par cm. Révélation par pulvérisation de saccharose sur la plaque de gélose, apparition de lévane par opalescence sur fond noir. Le disque, en haut, à gauche, correspond à la tache de départ.

Schéma n° 1 : Hypothèse d'une hétérogénéité de l'enzyme ou de la présence d'une trace de lévane dans la tache de départ.

Schéma n° 2 : Hypothèse d'une rétention par la gélose.

Schéma n° 3 : Résultat expérimental suivant l'image photographique.

phorétique, on devrait trouver, après électrophorèse suivant la seconde dimension, une diagonale d'activité (fig. 7, schéma n° 1). La même technique devrait donner, au contraire, un rectangle d'activité s'il s'agit d'une simple rétention sur la gélose (fig. 7, schéma n° 2). L'expérience montre (fig. 7, schéma n° 3) qu'on trouve les deux images réunies, ce qui ne permet aucune conclusion définitive, mais donne à penser que les deux effets coexistent à pH 6,2.

La figure 6 donne la répartition quantitative des activités obtenues par dosage de sucre réducteur suivant la méthode 3^e, page 20. A tous les pH étudiés, l'enzyme migre vers le pôle positif. Il est

impossible d'étudier la migration à pH inférieur à 4,0 car l'enzyme s'inactive alors rapidement. En étudiant la mobilité du pic d'activité en fonction du pH, on trouve que le point isoélectrique de l'enzyme est situé au voisinage de pH 4,0. L'enzyme s'inactiverait donc à son point isoélectrique. Nous avons observé la même inactivation avec les préparations non purifiées.

Nous avons essayé d'utiliser les données précédentes pour une

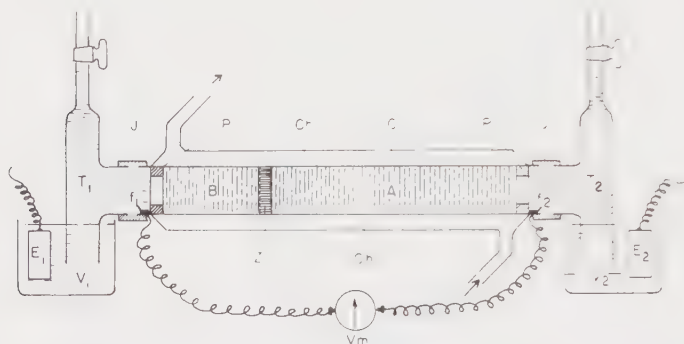


FIGURE 8 A. — Colonne d'électrophorèse en gélose.

C : Colonne de verre Pyrex, longueur 445 mm, diamètre intérieur 31 mm.

La longueur utile occupée par la gélose dans la colonne est d'environ 400 mm.

Ch : Chemise de refroidissement à circulation de saumure à 2°.

P : Anneaux en polythène immobilisant la gélose pendant l'opération.

V₁ et V₂ : Vases à électrodes.

T₁ et T₂ : Tubes en T en Pyrex, diamètre 31 mm.

J : Joints de caoutchouc.

E₁ et E₂ : Electrodes impolarisables.

f₁ et f₂ : Electrodes de platine pour mesure de la D.D.P. dans la colonne.

V_m : Voltmètre.

Zi : Zone de dépôt du produit initial.

électrophorèse préparative sur colonne d'amidon selon Flodin et Porath [54]. Par cette méthode, nous n'avons obtenu aucun pic d'activité éluable, une activité faible est répartie sur un volume trop considérable de liquide effluent. Il est possible que l'enzyme se trouve adsorbé sur l'amidon.

Nous avons réussi l'électrophorèse préparative à l'aide d'une colonne de gélose dans les conditions suivantes :

- 1) la gélose est purifiée comme précédemment [35];
- 2) on utilise une colonne horizontale dont le schéma et les dimensions sont données par la figure 8 (A).

On prépare la quantité de gélose nécessaire pour le remplissage de la colonne : 300 ml, en solution dans le tampon approprié

à la température de 50° environ. Dans les expériences qui suivent j'ai opéré en tampon acétate de sodium-acide acétique à une force ionique 0,05, et pH 4,5. La colonne est placée verticalement sur son support, et l'extrémité inférieure est obturée avec un bouchon de caoutchouc.

On introduit d'abord la gélose sur une hauteur qui représente la partie qui se trouve dans le sens prévu du déplacement électrophorétique (zone A de la figure 8, A) et on attend le début de solidification de la gélose, qu'on remonte ensuite dans la colonne, avec un piston, jusqu'à affleurement au niveau supérieur du tube de verre. On rectifie alors la surface supérieure de la gélose au rasoir, suivant un plan perpendiculaire au grand axe de la colonne, et on redescend la gélose dans la colonne jusqu'à son emplacement A définitif. L'extrait actif provenant du deuxième stade de purification est mélangé en proportion adéquate avec de la gélose liquide à 40°, de manière à obtenir un mélange final en phase homogène au reste de la colonne. Le produit ainsi préparé (volume final 7 ml) est coulé sur la surface rectifiée, et, dès début de solidification, on remplit de gélose la zone B, jusqu'en haut de la colonne. Après solidification complète du système, on rectifie les frontières au rasoir et on immobilise la gélose par deux segments en polythène placés au contact des frontières. La colonne est placée horizontalement, et montée comme il apparaît sur la figure 8 (a). Dans mes expériences, le pôle positif est E 1, le pôle négatif est E 2, les tubes T 1 et T 2 sont remplis par aspiration de tampon acétate, homogène à celui qui imprègne la gélose, et on mesure la D.D.P. dans la colonne par deux électrodes de platine introduites au contact du liquide, sous les points J. La chemise Ch. est refroidie à 2° par de l'eau ou de la saumure circulante.

Dans mes expériences, la zone A mesure 30 cm, la zone B, 9 cm, et la zone de dépôt de l'extrait enzymatique 10 mm.

Marche de l'électrophorèse. — On fait passer le courant avec une D.D.P. mesurée de 2 volts par cm et une intensité de 30 M.A., pendant 10 heures à 2°.

Au bout de ce temps, on démonte la colonne, et on fait glisser la colonne d'agar vers une extrémité du tube de verre. A mesure qu'elle est extraite avec un piston, la portion d'agar est découpée au rasoir en rondelles de 1 cm d'épaisseur, cylindriques, qu'on numérote et qu'on conserve dans les boîtes de Petri à 0°.

L'activité de l'enzyme dans chaque fraction est ensuite dosée exactement comme dans le cas des plaques de gélose (chap. 1). Dans ce cas, on prélève à l'emporte-pièce des échantillons identiques sur chaque rondelle d'agar.

On trouve ainsi un pic d'activité unique, placé dans les conditions expérimentales que je viens de décrire, à 5 cm environ de la frontière de la zone de départ. Lorsque le remplissage de la colonne est correctement effectué, il ne reste aucune activité dans la zone initiale, mais lorsque le remplissage est trop lent, il se crée

TABLEAU II. — *Purification de la lévane-sucrase de Bacillus subtilis.*

Volume total exprimé en millilitres.

Activité = Nombre de μ mol. de fructosyl, transférées par minute.

Activité totale = Volume $\times$ Activité par ml.

Azote par ml : exprimé en μ g d'N titré par la méthode de Nessler.

Pureté = Activité/mg d'azote.

EXTRAIT	VOLUME TOTAL	ACTIVITÉ	ACTIVITÉ TOTALE	AZOTE PAR ml	PURETÉ
Extrait brut (liquide de culture)	9.000	1,52	13.700	58,3	31
Extrait brut centrifugé.	8.500	0,73	6.300	45	16,4
Culot de centrifugation.	500	9,25	4.600	120	77
Précipité par le sulfate d'ammonium à saturation	110	2,36	248	210	11,5
Précipité entre 65 et 85 % de la saturation de SO_4Am_2	20	12,30	246	165	74,5
Extrait après électrophorèse	7	9,05	63	12,2	750

* La perte considérable de pureté et d'activité lors de la précipitation au sulfate d'ammonium provient de la séparation totale de la lévane.

une surface de discontinuité de la zone initiale, et on observe une petite activité dans cette zone après électrophorèse.

La répartition des activités dans la colonne suit très exactement la répartition observée sur les plaques (fig. 6, courbe 2) au même pH.

Mise en solution de l'extrait enzymatique purifié. — On peut extraire 70 % du liquide contenu dans les fractions d'agar actives, par pression de l'agar dans une seringue, à travers un papier filtre fin. Mais le liquide ainsi récupéré ne contient que des quantités d'enzymes très faibles.

Ceci montre que la gélose possède un pouvoir adsorbant pour l'enzyme. Cependant, on peut remettre l'enzyme en solution par électrodialyse. On utilise pour cela le même appareil que pour l'électrophorèse. On place dans le tube de verre les fractions de gélose actives maintenues en place par deux cylindres minces de gélose homogène, gélifiées dans le même tampon. On remplit alors la colonne de tampon et on bouche l'extrémité positive du tube de verre par une membrane de dialyse (fig. 8B). On monte les con-

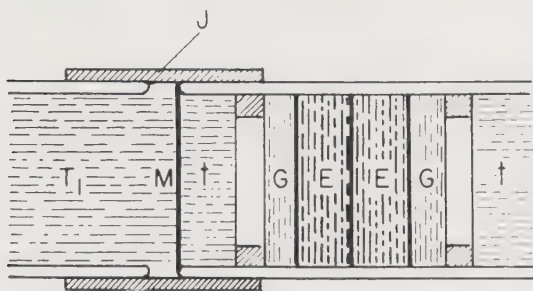


FIGURE 8 B. — Appareil d'électrodialyse.

L'appareil figuré est une portion de l'appareil de la figure 8 A. — Diamètre intérieur : 31 mm. — E : Fractions d'agar contenant l'activité. — G : Cylindres d'agar maintenant E en place. — P : Anneaux en polythène. — M : Membrane semi-perméable. — T₁ : Tube en T. — J : Joint en caoutchouc.

Montage identique à celui de la figure 8 A.

nections électriques comme sur la figure 8A et on laisse passer le courant dix heures avec une D.D.P. de 2 volts/cm à 2°.

On retrouve alors 85 % de l'activité totale dans le tampon, du côté positif du cylindre d'agar, et on peut pipetter le liquide actif.

L'extrait ainsi obtenu est le plus purifié que j'ai préparé (tableau II). Une expérience d'analyse chromatographique m'a montré que ses propriétés enzymatiques ne diffèrent pas qualitativement de celles des extraits moins purifiés, et en particulier, des extraits précipités par le sulfate d'ammonium entre 65 et 85 % de la saturation. C'est pourquoi les expériences qui suivent ont pu être faites avec des extraits au deuxième stade, plus simples à préparer en quantité importante.

Les extraits purifiés par électrophorèse ne contiennent aucune trace de lévane, ni d'autre polyside, décelables par chromatographie sur papier. Leur pureté, mesurée par la méthode manométrique, est multipliée par 24, par rapport à celle de l'extrait brut.

CHAPITRE III

ÉTUDES DE QUELQUES PROPRIÉTÉS DE LA LÉVANE-SUCRASE

I. — ACTION DU pH SUR L'ENZYME DE *B. subtilis*

Hestrin et ses collaborateurs [80] ont déjà étudié l'action du pH sur l'activité de la lévane-sucrase d'*Aerobacter levanicum*. Ils ont trouvé une variation monophasique de l'activité avec un optimum vers pH 5,6.

J'ai déterminé d'abord la courbe d'activité en fonction du pH, des extraits préparés par les méthodes précédentes, afin d'opérer ensuite au voisinage de l'optimum, et de vérifier si la forme de la courbe et l'optimum d'activité était les mêmes que dans le cas des extraits d'*Aerobacter*. Un autre but de ces expériences était de mesurer le rapport des concentrations de fructose et de lévane, produits de la réaction à divers pH, ce qui pouvait donner des indications précieuses pour résoudre le problème de l'unicité ou de la multiplicité des fructosidases dans mes extraits. Comme nous l'avons vu, on pouvait, en effet, supposer que l'activité invertasique était distincte de l'activité synthétisant le polyside.

Pour ces raisons, je n'ai pas étudié l'activité de l'enzyme en fonction du pH par la méthode manométrique, mais par chromatographie quantitative des glucides produits après incubation du saccharose avec l'extrait enzymatique à divers pH.

Après incubation, les extraits sont inactivés par chauffage, cinq minutes à 100°, puis étalés sur un chromatogramme de papier Arches 304. On place trois taches du même extrait côte à côte, deux taches de 4 μ l encadrant une tache de 20 μ l.

Après développement du chromatogramme quarante heures sur butanol éthanol eau, les deux taches témoins de 4 μ l sont révélées par le phtalate acide d'aniline et l'urée chlorhydrique. On découpe, puis on élue les taches homologues de 20 μ l. On dose sur le liquide d'élution la lévane et le fructose (chap. I).

La fig. 9 donne la variation d'activité en fonction du pH : l'optimum est vers pH 6,0 et le rapport fructose-lévane formé est constant en fonction du pH ($\frac{F}{L} = 1,3$ environ), ce qui est en faveur de la présence d'un seul enzyme dans les extraits. Les courbes sont monophasiques.

L'expérience précédente comporte l'emploi de tampons diffé-

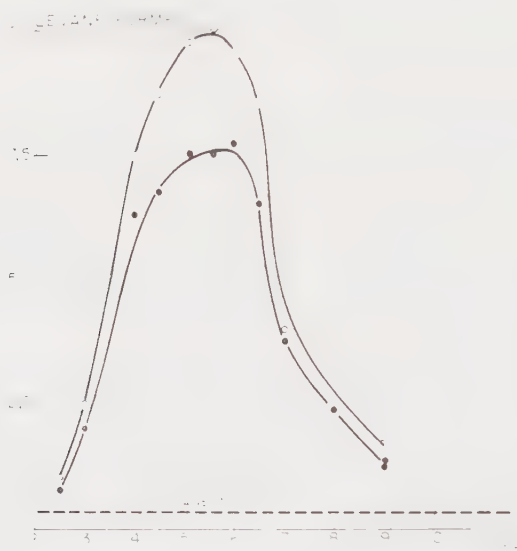


FIGURE 9. — *Activité de la lévane-sucrase en fonction du pH.*

Conditions expérimentales :

Pour chaque pH : Extrait 0,10 ml (0,42 U). Saccharose, solution à 60 % 0,05 ml, lévane*, solution 2 %, 0,05 ml. Tampon $\mu = 0,01$, 0,10 ml. Volume total 0,03 ml.

Tampons : pH 9 à pH 7, trishydroxyméthylaminométhane + HCl;

pH 7 à pH 5, PO_4KH_2 - $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$;

pH 5 à pH 2, $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ - Acide citrique.

Incubations 4 heures à 37° en présence de CHCl_3 .

Chromatogrammes sur 20 μ l.

Abcisses : pH

Ordonnées : Lévane —●—●— mg/ml
Fructose —○—○— mg/ml

(*) Présence de lévane voir paragraphe IV.

rents, le long de la gamme du pH; j'ai étudié l'effet du tampon sur l'activité de l'enzyme.

L'extrait utilisé précédemment est dialysé 48 heures avec agitation contre du tampon histidine-HCl 0,2 M, pH 6,5, renouvelé fréquemment. On met ensuite en incubation à 37° l'extrait dialysé ou non, en présence de saccharose, dans les conditions suivantes :

I		II	
Extrait dialysé 0,5 ml (0,72 U)		Extrait dialysé 0,5 ml (0,72 U)	
Saccharose à 60 %..	0,17 ml	Saccharose à 60 %..	0,17 ml
Tampon histidine- HCl $\mu=0,1$, pH 6,5.	0,33 ml	Tampon phosphate $\mu=0,1$, pH 6,5...	0,33 ml
Volume total	1 ml	Volume total	1 ml

III

Extrait non dialysé. 0,5 ml (0,72 U)	
Saccharose à 60 %..	0,17 ml
Tampon phosphate $\mu=0,1$, pH 6,5...	0,33 ml
Volume total	1 ml

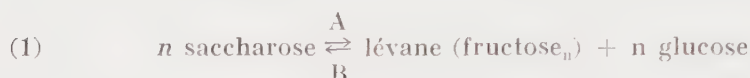
L'essai n° 1 avant ou après incubation ne contient pas de phosphore minéral décelable par la méthode de Fishke et Subarrow [53], soit moins de 1 μ g par ml.

Les incubations sont menées à 37° en présence de chloroforme, on prélève 10 μ l de chacun des trois essais qu'on porte sur un chromatogramme aux temps zéro, 3 h, 6 h, 17 h, 24 heures.

Le chromatogramme ne montre après révélation aucune différence entre les taches dues au fructose, au glucose, à la lévane et aux oligosides, pour chacun des trois essais, ce qui montre que le tampon ne joue aucun rôle dans la variation de l'activité en fonction du pH et confirme les expériences d'Hestrin et ses collaborateurs [80] montrant que le phosphore minéral n'entre pas dans la réaction due à la lévane-sucrase. Comme dans le cas de l'enzyme d'Hestrin, il n'y a pas de perte d'activité sensible par dialyse et on ne peut mettre en évidence aucun coenzyme dissociable.

II. REVERSIBILITE DE LA REACTION ENZYMATIQUE. SYNTHESE DU SACCHAROSE

La réaction de la lévane-sucrase sur le saccharose se traduit par la réaction (1) dans le sens A.



Cependant, l'inhibition de la réaction 1 A par le glucose est de type compétitif [80].

Ceci laissait penser que la réaction inverse 1 B devait pouvoir être mise en évidence, et c'est ainsi qu'en déplaçant l'équilibre de la réaction dans le sens B par addition d'invertase, Doudoroff et O'Neal [47] ont établi une présomption de réversibilité, mais les conditions expérimentales n'avaient pas permis l'isolement du saccharose formé et la réaction 1 B restait hypothétique.

Cependant, l'étude de cette réaction permet d'obtenir des renseignements complémentaires sur l'énergétique de la réaction de synthèse de lévane et sur le mécanisme d'action de l'enzyme. Etant donné la haute énergie de la liaison diosidique dans le saccharose [44,69], il était à prévoir que l'équilibre serait réalisé en présence d'une concentration moléculaire élevée de lévane et de glucose et d'une faible concentration de saccharose. Afin d'observer la réaction 1 B, j'ai donc opéré en présence de lévane naturelle partiellement dépolymérisée par hydrolyse ménagée et de P.M. 5.500 environ [41]. Ceci permet d'augmenter la concentration moléculaire, pour une même concentration pondérale de lévane.

On met en incubation à 37°, en présence de chloroforme, les produits suivants en solution dans du tampon de phosphate 5.10⁻³ M, pH 6,2 :

lévane.	1 g
D-glucose	1 g
extrait enzymatique	4,60 unités (376 µg N)
volume total	10 ml

On effectue, à intervalles réguliers, des prélèvements qu'on analyse par chromatographie sur papier et révélation, soit au phtalate acide d'aniline, et à l'urée chlorydrique, soit au T.T.C. (chapitre 1).

A partir de trois heures d'incubation, on observe sur le chromatogramme la présence d'une tache de déplacement identique à

celui du saccharose témoin. Cette tache n'a pas de pouvoir réducteur car elle ne se révèle pas par le T.T.C., mais devient réductrice après action de l'invertase.

Le produit correspondant à cette tache a été séparé des autres glucides en réaction, et élué par de l'alcool à 5 % sur une colonne de charbon-célite suivant la technique de Whistler et Durso (chapitre 1). Le produit ainsi élué est chromatographiquement pur, et son Rf est identique à celui du saccharose (tableau III).

On concentre et on cristallise deux fois dans l'alcool le produit de l'éluion et on obtient 19 mg de cristaux blancs dont l'analyse donne les résultats du tableau III. Le produit obtenu est donc bien du saccharose.

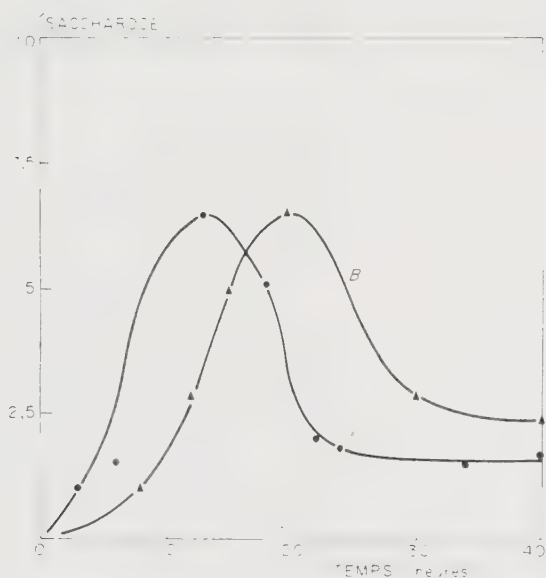


FIGURE 10. — Synthèse du saccharose en présence de lévane-sucrase.

Conditions expérimentales :

Courbe A. Extrait enzymatique	1,6 ml (1,00 Unité)
Glucose	400 mg
Lévane	400 mg
Tampon phosphate 10^{-2} M, pH 6,5	
Volume total	4 ml
Courbe B. Extrait enzymatique	0,5 ml (0,20 Unité)
Glucose	100 mg
Lévane	100 mg
Tampon phosphate 10^{-2} M, pH 6,5	
Volume total	1 ml

Abscisses : Temps en heures.

Ordonnées : Saccharose formé en grammes par litre.

Chromatographies sur 20 μ l, dosages du saccharose, après éluion, par la méthode de Roë.

Il contient probablement une faible proportion d'un dioside réducteur distinct qui ne peut en être séparé chromatographiquement.

J'ai suivi par chromatographie quantitative la cinétique de la réaction 1 B. La figure 15 donne les résultats obtenus. La concentration du saccharose passe par un maximum. On a alors :

$$[\text{saccharose}] = 6,5 \text{ grammes par litre.}$$

Puis la concentration de saccharose diminue au cours du temps, pour se stabiliser finalement à une valeur voisine de 2 grammes par litre.

J'examinerai, dans la discussion de ces résultats expérimentaux, l'interprétation que l'on peut donner de l'aspect de ces courbes. Nous verrons qu'il est possible d'établir la constante d'équi-

TABLEAU III . — *Analyse du produit de l'action de la lévane-sucrase sur la lévane et le glucose.*

RÉACTION	PRODUIT ANALYSÉ	SACCHAROSE
α 18° D	64° ± 5 %	66°
<i>Avant hydrolyse</i>		
Pouvoir réducteur	3,5 **	0 **
* Réaction de Raybin	positive	positive
Temps de demi-hydrolyse par la saccharase de levure.....	28 minutes	29 minutes
<i>Après hydrolyse</i>		
Glucose (par la glucose oxydase)	54,1 **	53,0 **
Fructose (par la méthode de Roe)	56,8 **	54,2 **

(*) Réaction de Raybin : Réaction avec le diazo-uracile, en milieu alcalin : coloration verte spécifique du saccharose (132).
(**) Valeurs en pour cent du même poids d'hexose.

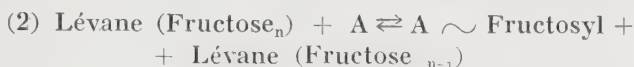
libre de la réaction (1), et à l'aide de la valeur ainsi obtenue, la valeur de l'énergie de liaison osidique de la molécule de lévane.

Enfin, il faut noter que l'incubation de l'extrait enzymatique en présence de glucose seul ou en présence de lévane seule ne donne naissance à aucun produit décelable chromatographiquement. Il est notable, en particulier, que l'enzyme n'hydrolyse pas la

lévane, alors qu'il se forme un peu de fructose libre en présence de glucose et de lévane. Son apparition est toujours postérieure à l'apparition de la tache de saccharose sur le chromatogramme, et il y a tout lieu de penser qu'il se forme par hydrolyse de ce dernier produit, comme dans la réaction directe.

III. — SYNTHÈSE DE DIHOLOSIDES ANALOGUES DU SACCHAROSE

La possibilité d'obtenir du saccharose par réversion à partir de la lévane et du glucose, m'a permis d'étudier la spécificité de l'accepteur de fructosyl de la réaction catalysée par la lévane-sucrase :



D'après les expériences antérieures [80], on savait déjà que A n'est pas quelconque puisque la lévane-sucrase n'agit pas sur le

TABLEAU IV. — Apparition d'osides en présence de divers oses et de lévane
Conditions expérimentales :

Dans chaque expérience : Ose 25 mg, lévane 25 mg, enzyme 0.125 ml (0,125 U), tampon phosphate 10^{-2} M pH 6,5. Volume total 0,250 ml. Solvant chromatographique : Butanol, éthanol, eau 4,0 / 1,1 / 1,9.

Le nombre des croix donne l'importance relative des taches observées sur le chromatogramme.

OSÉS MIS EN INCUBATION	APPARITION D'UNE TACHE DE DIOSIDE EN		Rf DE LA TACHE
	12 heures	24 heures	
D-Glucose	+	+++	0,175
D-Mannose	0	0	—
D-Galactose	0	++	0,170
D-Xylose	+	+++	0,210
D-Arabinose	0	0	—
L-Arabinose	0	+	0,200
D-Ribose	0	0	—
L-Rhamnose	0	0	—
L-Sorbose	0	0	—
D-Fructose	0	0	—
D-Glycuronate de Na	0	0	—
α -Méthylglucoside	0	0	—

β -méthylfructofuranoside, par exemple, produit qui peut pourtant être hydrolysé par l'invertase. J'ai étudié la spécificité du radical lié au fructosyl en remplaçant dans la réaction (3) le glucose par

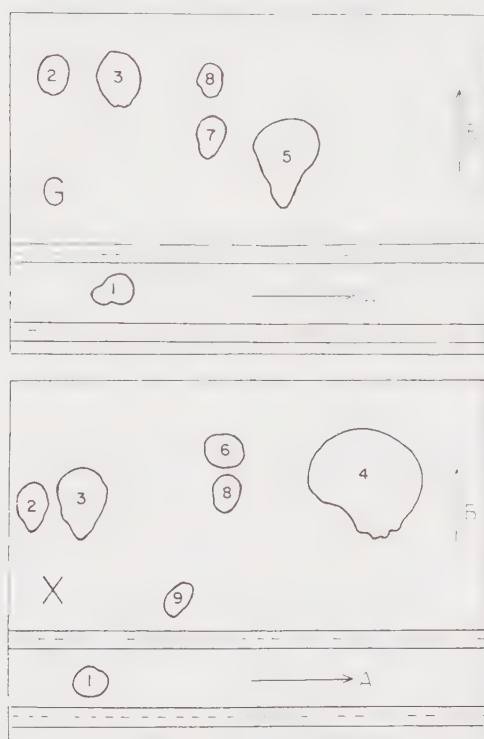


FIGURE 11. — Analyses chromatographiques du xylofructoside (X) et du galactofructoside (G).

Des mélanges de lévane et de xylose (X) ou de galactose (G) ont été mis en incubation 24 h à 37°, en présence de lévane-sucrase. Des taches de ces deux mélanges sont alors déposées sur les bandes de papier A, puis développées (de gauche à droite sur les figures). Les bandes A sont alors séchées puis soumises à l'action de l'invertase, puis séchées et développées suivant B, par le mélange Butanol, acide acétique, eau, sur des feuilles de papier neuves cousues aux bandes A suivant les pointillés.

On observe, après révélation:

- 1) Taches de lévane immobiles dans les deux sens.
- 2) Tache de fructose témoin, placée à côté de la tache 1 sur les bandes A, avant développement dans le sens B.
- 3) Tache de fructose provenant de l'hydrolyse partielle de la lévane par l'invertase.
- 4) Tache de xylose déplacée successivement dans les sens A, puis B.
- 5) Tache de galactose déplacée comme dans le cas de la tache 4.
- 6) Tache de xylose provenant du dioside déplacé suivant A, puis hydrolysé et déplacé suivant B.
- 7) Tache de galactose provenant du dioside, formée dans les mêmes conditions que la tache 6.
- 8) Taches de fructose des diosides formées dans les mêmes conditions que les taches 6 et 7.
- 9) Oligosides non hydrolysés par l'invertase, non étudiés dans ce travail.

d'autres oses. Le tableau IV donne les résultats de mes expériences.

J'ai mis en incubation, en présence de chloroforme, la lévane déjà utilisée précédemment (P.M. = 5.500) et le glucide étudié.

En étudiant par des prélèvements portés sur des chromatogrammes la composition des mélanges glucidiques, on voit apparaître en présence de certains oses, des taches révélables par l'urée-HCl, mais non par le phtalate acide d'aniline qui révèle les aldoses,

ni par le T.T.C., ce qui montre que ce ne sont pas des glucides réducteurs.

Les chromatogrammes développés sur butanol-acide acétique-eau des produits de la réaction de la lévane avec chaque aldose actif (tableau IV) peuvent être développés suivant la seconde dimension après action de l'invertase 1 h à 37° [137] (fig. 11). On observe alors que la tache unique révélable après le développement suivant la première dimension a donné naissance par hydrolyse à deux taches de Rf identiques à ceux du fructose et de l'aldose utilisé dans le mélange en incubation en présence de l'enzyme.

Après chromatographie suivant la première dimension, j'ai élué les composés formée en présence de D-xylose et D-galactose. Ces produits sont hydrolysés par l'invertase, puis placés quantitativement sur un nouveau chromatogramme côte à côte avec des taches témoins de D-fructose et de l'aldose étudié, formant une échelle de concentration. Après développement et révélation, les chromatogrammes montrent que les oses sont présents dans les proportions suivantes :

Xylofructoside	{	Xylose	25 µg ± 5 %
		Fructose	20 µg id.
Galactofructoside	{	Galactose	15 µg id.
		Fructose	15 µg id.

L'expérience n'a pu être complétée par l'étude identique du L-arabino-fructoside, ce produit étant formé en quantité plus faible.

Nous possédons ainsi sur les produits étudiés les informations suivantes :

- 1) ils sont le résultat de l'activité de la lévane-sucrase;
- 2) leur position sur le chromatogramme suggère qu'il s'agit de dioisdes, sûrement pas de tétra-oses.
- 3) ils ne sont pas réducteurs;
- 4) ils sont hydrolysables par l'invertase;
- 5) ils contiennent en quantité équimoléculaire du fructose et l'aldose actif qui leur a donné naissance;
- 6) dans le cas où cet aldose est le D-glucose, le produit formé est le saccharose.

L'équimolarité des oses constituants n'a pu être vérifiée dans le cas du L-arabinose; les résultats précédents ne peuvent donc lui être étendus qu'à titre hypothétique.

Je n'ai pas entrepris l'isolement de ces corps en quantité pondérable, cependant les éléments d'identification précédents rendent très plausibles une constitution analogue à celle du saccharose.

Le reste glycosyl est alors remplacé par un reste aldosyl suivant les formules de cette figure (fig. 16).

La structure β de la liaison glycosique du fructofuranosyl résulte de la spécificité connue de l'activité de l'invertase [61, 98] sur ce type de structure. La structure α ou β (fig. 12) de la liaison

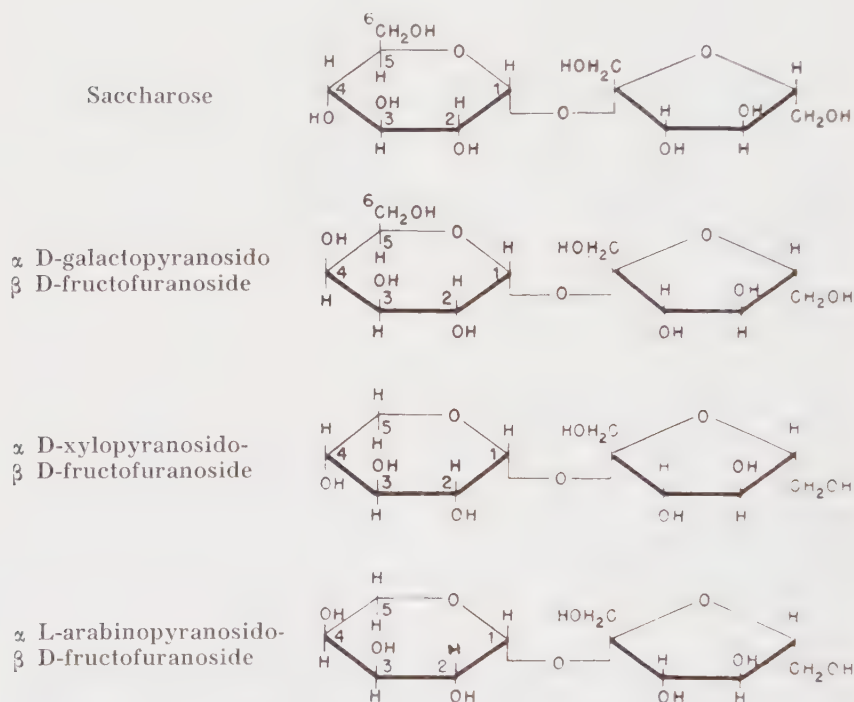


FIGURE 12. — Formules probables de diholosides analogues du saccharose.

osidique de l'aldose peut être présumée par analogie avec la structure du saccharose synthétisé par le même enzyme. Dans le cas du xylofructoside, la structure α de la liaison L-xylosyl a été démontrée par Avigad, Feingold et Hestrin [4] dont les résultats confirment ceux de ce travail [115].

D'après la liste des oses essayés (tableau IV), il apparaît que seuls les aldoses sont actifs et peuvent remplacer le glucose dans la synthèse d'analogues du saccharose par la lévane-sucrase. Parmi les aldoses, seuls ceux dont l'hydroxyle est en *cis* et l'hydroxyle 3 en *trans* par rapport à la position α de la liaison semi-acétalique,

sont capables de réagir sous l'action de l'enzyme. L'hydroxyle en 4 favorise la réaction lorsqu'il est en *cis*, sans que cette position paraisse essentielle. La nature et la position des radicaux en 5 ou 6 n'ont pas de rôle apparent, cependant la présence d'un carboxyle en 6 (acide D-glycuronique) inhibe la réaction.

IV. — EFFET DE LA LEVANE EMPLOYEE COMME PRECURSEUR SUR LE BILAN DE LA REACTION

Mes expériences de purification des extraits enzymatiques m'avaient montré que la lévane-sucrase possédait une forte affinité pour le polyoside (chapitre II), ce qui laissait supposer une liaison entre l'enzyme et le produit de la réaction. Mais je n'étais pas renseigné par ces expériences sur la nature de cette liaison. Il paraissait ainsi désirable d'étudier la spécificité et la labilité de la liaison entre le polyoside et la lévane-sucrase.

Un autre problème, posé déjà dans l'historique de ce travail, consistait à déterminer le rôle de la lévane préexistante dans la synthèse enzymatique du polyoside, ce qui devenait possible avec les extraits enzymatiques débarrassés de leurs impuretés glucidiques.

On sait, en effet, que certaines glycosidases, telles le phosphorylase de pomme de terre, ne peuvent agir qu'en présence d'un précurseur de la synthèse constitué par une chaîne de même nature que le polyoside synthétisé par l'enzyme, comme Hanes l'a montré dès 1940 [65, 67], et on sait que la longueur de la chaîne doit être au minimum de trois restes glycosyl (maltotriose). L'effet auto-catalytique n'est optimum qu'à partir de quatre restes [133].

Cependant ceci ne permet pas de confirmer, dans le cas précédent, l'existence d'un complexe stable, enzyme-polyoside, suivant l'hypothèse de Stacey [127], car la synthèse est « multichaîne », c'est-à-dire que toutes les molécules grossissent en même temps, comme l'ont démontré Whelan et Bailey [133]. On sait aussi, depuis longtemps, que la dextrane-sucrase donne des produits différents en présence ou en l'absence de dextrane précurseur [124]. Hellman, Tsuchiya et leurs collaborateurs [76, 129] et Stacey [126] ont montré qu'à la fois le rendement en dextrane, la vitesse de la réaction et le poids moléculaire moyen du polyoside formé sont modifiés par la présence de précurseur. Les résultats précédents sont particulièrement intéressants, en raison de similitudes évidentes entre l'action de la dextrane-sucrase et celle de la lévane-sucrase.

Cependant, Hestrin et ses collaborateurs [5, 80] n'avaient pas pu mettre en évidence un effet initiateur ou inhibiteur des lévanes sur leur propre synthèse en présence de l'extrait enzymatique, mais l'interprétation de ces résultats restait difficile, car il n'était pas certain que leur extrait enzymatique, non purifié par ces auteurs, ne contînt pas de lévane initiale.

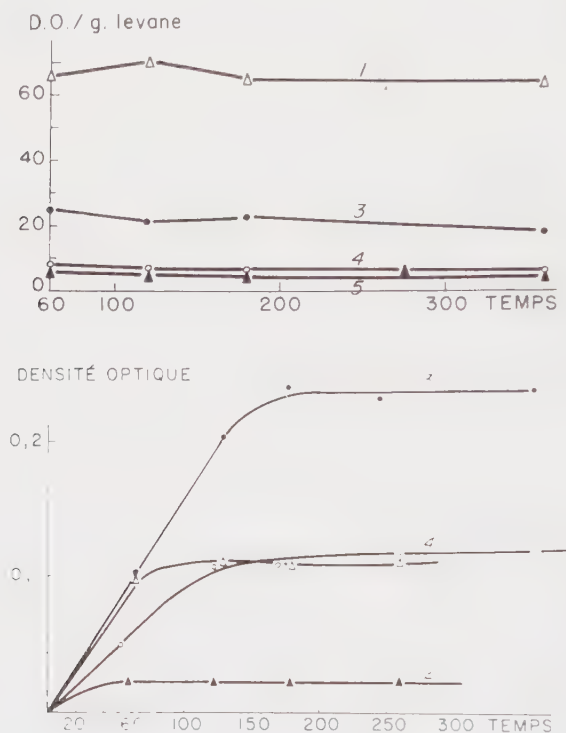


FIGURE 13. — Opacité des lévanes formées en présence ou en l'absence de lévanes précurseurs.

Conditions expérimentales : Identiques à celles du tableau V.

	Saccharose initial	Lévane initiale
Courbes 1	25 g par litre	0 g par litre
2	25 —	20 —
3	100 —	0 —
4	100 —	20 —

Cadre inférieur : Variation de la densité optique des mélanges mis en circulation.

Abscisses : temps en minutes.

Ordonnées : densité optique absolue.

Cadre supérieur :

Abscisses : temps en minutes.

Ordonnées : rapport entre la densité optique et la concentration en lévane (densité optique relative).

J'ai donc étudié quantitativement les produits de la réaction de l'enzyme sur le saccharose en présence ou en l'absence de lévane « précurseur » préalablement ajoutée au milieu réactionnel. J'ai suivi en même temps les variations d'opacité du milieu au cours de la réaction (fig. 13).

Les mélanges réactionnels constitués comme l'indique le tableau V sont mis en incubation à 37°, en présence de chloroforme. Les prélèvements effectués aux temps indiqués sont immédiatement portés sur un papier chromatographique et inactivés sur le papier par une tache de 5 µl de chlorure mercurique à 5 pour mille, préa-

TABLEAU V. — *Synthèse enzymatique de lévane : bilan de la réaction.*

Conditions expérimentales : Mélanges mis en incubation : Extrait enzymatique 4,4 unités. Saccharose et lévane précurseur : concentration indiquée en tête du tableau, tampon de phosphate 10^{-2} M, pH 6,2, volume total de chaque mélange : 6 ml. Incubation à 37° en présence de chloroforme.

Analyses des mélanges après incubation par chromatographie, papier Arches 304, taches initiales de 20 µl, course de 40 heures, solvant : butanol, éthanol, eau.

Dosages des glucides après élution du papier :

Lévane, saccharose et fructose par la méthode de Roé,

Glucose par la méthode de Nelson.

Valeurs du tableau indiquées en grammes par litre :

COMPOSITION DU MILIEU MIS EN INCUBATION								
		I	II	III	IV			
Saccharose		25	25	100	100			
Lévane		0	20	0	20			

Temps (min)	FORMATION DE FRUCTOSE				FORMATION DE LÉVANE			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
60	6,60	1,20	8,80	5,40	1,50	4,00	4,05	10
180	10,00	5,60	17,10	11,80	1,75	5,50	10,35	20,40
360	10,00	5,60	18,90	13,50	1,75	5,50	12,70	24,00

Temps (min)	DISPARITION DU SACCHAROSE				FORMATION DE GLUCOSE			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
0	25	25	100	100	—	—	—	—
60	7,8	5,3	44,3	45,5	10,65	10,65	12,90	19,50
180	0,5	0,5	13,5	17,1	12,90	11,30	31,00	37,50
360	0,5	0,5	9,4	4,6	12,90	11,30	37,20	46,00

lablement déposée et séchée au même point du papier, selon la technique de Bealing et Bacon [14]. Des taches analogues sont juxtaposées pour permettre le repérage qualitatif, après résolution chromatographique. Les différents glucides sont ainsi séparés par découpage de la zone repérée, et ensuite élués et dosés suivant la technique décrite au chapitre I. La lévane formée est dosée par différence avec la lévane initiale contenue dans le milieu en expérience.

Les mesures de l'opacité sont faites directement dans les tubes contenant le mélange réactionnel. Il est important de préciser que l'opacité relative de la lévane initiale employée est très faible (densité optique de la solution à 2 pour cent : 0,02). L'opacité due à la présence de l'extrait enzymatique est nulle et reste nulle comme le montre l'expérience que nous avons faite avec un témoin ne contenant pas de saccharose.

On observe alors (fig. 13 et tableau V) deux phénomènes distincts :

1° En présence de lévane précurseur, le rendement en lévane formée augmente considérablement, aux dépens du fructose libre, dont la formation diminue corrélativement.

2° L'opacité relative des lévanes formées en présence de précurseur est très faible, si on la compare à l'opacité des lévanes formées en l'absence de précurseur. On peut interpréter ce dernier phénomène par un abaissement du poids moléculaire moyen des lévanes formées en présence de précurseur. Je n'ai effectué aucune mesure du poids moléculaire des lévanes de synthèse enzymatique, mais de telles mesures ont été faites récemment par Mattoon et ses collaborateurs [101] qui ont démontré par précipitation fractionnée des lévanes dans le méthanol, que le poids moléculaire moyen des polyosides formés par un extrait enzymatique brut était fortement abaissé par la présence de molécules de polyoside précurseur.

Confirmant et complétant les résultats de Mattoon, obtenu indépendamment et simultanément, les expériences précédentes fournissent une démonstration de l'influence de la lévane initiale sur le bilan de la réaction, et sur la nature des produits formés, mais elles restent insuffisantes pour nous renseigner sur le mode d'action du précurseur car la durée de l'expérience est nécessairement trop longue pour étudier la cinétique de la réaction. Il se forme du reste, dans tous les cas, de la lévane, même en l'absence de précurseur, le saccharose lui-même paraissant pouvoir jouer le rôle d'initiateur. En outre, le bilan précédent ne tient pas compte des oligosides, ce qui le rend incomplet.

V. — BILAN DE LA REACTION CATALYSEE
PAR LA LEVANE-SUCRASE
EN PRESENCE DE SACCHAROSE RADIOACTIF

La modification expérimentale du bilan de la réaction par l'addition de précurseur m'a fourni une méthode de mesure permettant de calculer ensuite les constantes d'affinité de l'enzyme avec le substrat et les produits de la réaction, et d'obtenir ainsi des données sur le mode d'action de l'enzyme.

Mais nous venons de voir que le temps de réaction, trop long dans les expériences qui précèdent, ne permet pas d'utiliser les résultats obtenus pour une étude cinétique.

Ces difficultés ont pu être levées par l'emploi de saccharose

TABLEAU VI. — *Action de la lévane-sucrase sur le saccharose radioactif.*

Conditions expérimentales : Pour chaque expérience : Extrait enzymatique 0,13 U dans 0,03 ml de tampon (4,1 μ g N). Tampon phosphate pH 6,2, 0,01 M. Volume total 0,1 ml. Incubation 3 minutes à 37°. Chromatographie sur 10 μ l.

Le dosage de la radioactivité est fait : a) pour la lévane par comptage direct sur le papier chromatographique après développement; b) pour les autres glucides par autoradiographie, enregistrement photoélectrique des autogrammes et planimétrie des courbes enregistrées suivant la méthode décrite au chapitre I.

Activité spécifique du saccharose employé : 2 μ C/mg = 100.000 impulsions/minute.

Valeurs exprimées en impulsions/minute.

EXP.	SACCHAROSE	LÉVANE	FRUCTOSE	GLUCOSE	TRICOSIDE	LÉVANE
1	200	60	1.350	5.150	750	4.170
2	100	60	1.250	4.700	450	4.160
3	50	60	900	4.650	225	3.760
4	25	60	550	2.750	125	3.030
5	200	30	1.700	5.100	1.100	2.510
6	100	30	1.400	3.970	600	2.760
7	50	30	1.170	3.350	300	2.750
8	25	30	950	3.000	175	2.880
9	200	10	1.700	4.350	900	2.020
10	100	10	1.600	2.970	700	1.240
11	50	10	1.650	3.130	375	1.430
12	25	10	1.500	2.130	220	1.050
13	200	0	3.300	5.000	1.300	940
14	100	0	2.970	3.150	850	300
15	50	0	2.300	2.650	425	340

radioactif, employé comme substrat, ce qui augmente considérablement la sensibilité des dosages et permet d'employer un temps de réaction de trois minutes seulement. On peut ainsi considérer que les conditions initiales sont conservées au cours de la réaction, ce qui permet d'obtenir des données cinétiques valables. Nous avons réalisé des mélanges réactionnels de 0,10 ml de volume total dans des microtubes. Chaque constituant du mélange (tableau VI) a été introduit dans le tube à l'aide d'une micro-seringue volumétrique AGLA (Burroughs, Welcome & Co, London). L'extrait enzymatique est introduit, extemporanément, en dernier lieu, et on place les

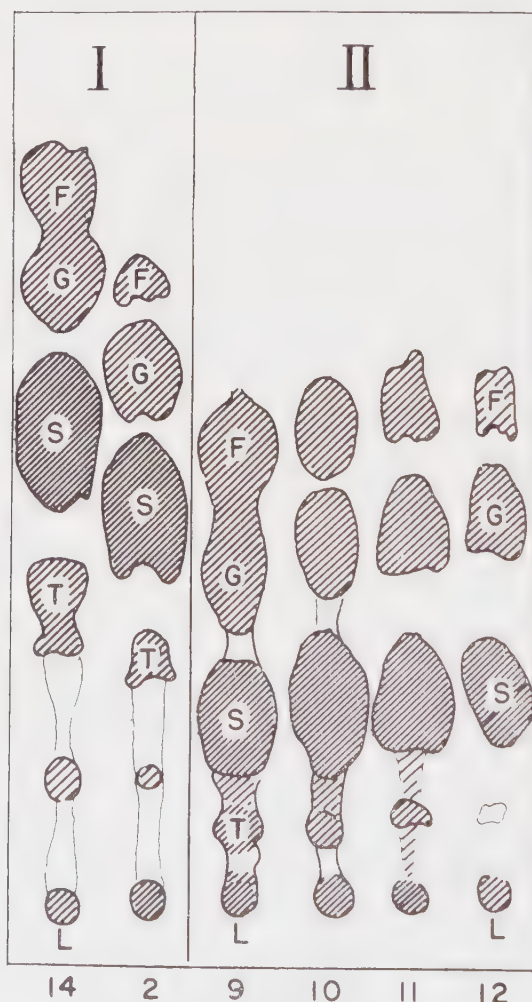


FIGURE 14. — Radiochromatographie des produits de l'activité de la lévane-sucrase.

Conditions expérimentales:

Voir le tableau VI.

Radioautogrammes développés par contact de 96 h avec le chromatogramme correspondant à 6 expériences du tableau VI.

I. Effet de l'addition de lévane initiale à la même concentration de saccharose.

Expériences 2 et 14 du tableau.

Développement sur Butanol-Ethanol-Eau.

II. Effet de la variation de concentration du saccharose.

Expériences 9, 10, 11, 12 du tableau.

Développement sur Butanol-Acide acétique-Eau.

L : Lévane (non mobile)

X: Triosides.

S: Saccharose.

G: Glucose.

F: Fructose.

tubes trois minutes à 37° au bain-marie, puis on inactive l'enzyme par chauffage cinq minutes à 100°. On chromatographie alors les échantillons sur papier Whatman n° 1, puis on analyse les différents glucides radioactifs comme nous l'avons décrit au chapitre 1.

L'examen direct des chromatogrammes donne l'aspect qualitatif du phénomène, (fig. 14). On distingue sur le chromatogramme, de haut en bas, les taches correspondant au fructose, au glucose, au saccharose, puis une série de taches d'oligosides et finalement la tache initiale où reste le polyside.

Conformément aux données de Dedonder et Noblesse [39], nous avons supposé que la première tache correspond à un trioside constitué de deux restes fructosyl et d'un reste glucosyl, formé par fixation de fructosyl sur la saccharose. Néanmoins, la forme des taches et l'allure des courbes d'enregistrement photoélectrique montrent qu'il s'agit probablement d'un mélange de plusieurs triosides distincts, sinon par leur composition en résidus fructosyl et glucosyl, mais par le mode de liaison des oses entre eux. Cependant, dans le court temps d'incubation pendant lequel nous opérons, il paraît raisonnable de supposer que le fructosyl n'ait pas d'autre dioside accepteur à sa disposition que le saccharose, ce qui permet d'écrire la réaction :



où G représente le glucose, F le fructosyl, $G \sim F$ le saccharose, et $G \sim F - F$ le trioside.

La figure 16 montre que la quantité de $G \sim F - F$ formée croît rapidement avec la concentration en saccharose, ce qui est conforme à l'hypothèse précédente. Nous reviendrons sur ce point lors de l'étude cinétique de la réaction.

L'examen des chromatogrammes confirme, en outre, les résultats de nos précédentes expériences : la lévane précurseur augmente visiblement la radioactivité de la tache de lévane et diminue considérablement la dimension de la tache de fructose. Il se forme, en outre, moins de triosides en présence d'initiateur. Le tableau VI donne une base quantitative au phénomène précédent. Par exemple, en présence de 50 g par litre de saccharose, le rapport fructose formé/lévane formée passe de 6,8 à 0,22, par addition de 6 % de lévane précurseur.

VI. — ETUDE CINETIQUE DE LA REACTION

Le tableau VI fournit les bases nécessaires pour l'étude cinétique de la réaction catalysée par la lévane-sucrase et permet de préciser nos idées sur l'activité relative des différents produits et substrats. Nous avons, pour cela, utilisé les données classiques

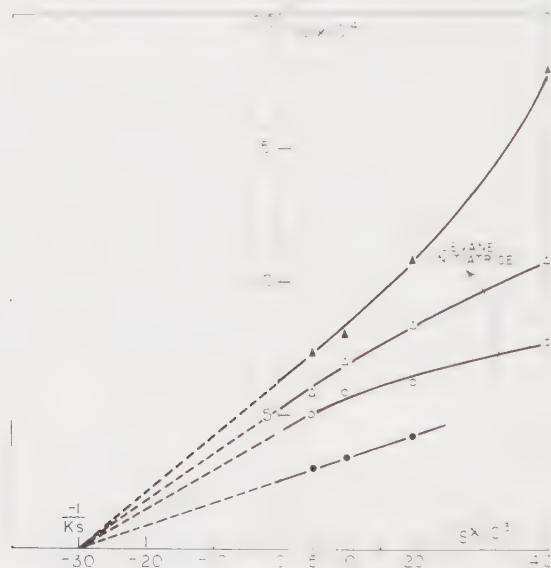


FIGURE 15. — Cinétique de l'activité de la lévane-sucrase.
Représentation de Lineweaver et Burk

I. — FORMATION DU FRUCTOSE LIBRE

Abscisses : Inverse de la concentration du saccharose (évaluée en grammes par litre).

Ordonnées : Inverse de la quantité de fructose libre formé par une réaction de 3 minutes.

Concentration du fructose exprimée en impulsions par minute (tableau VI).

La flèche représente le sens de variation de la concentration de lévane précurseur, maintenue constante sur chaque droite du réseau (tableau VI).

de Henri [77], et de Michaelis et Menten [102], avec les représentations graphiques de Lineweaver et Burk [99].

Les hypothèses de base utilisées dans cette étude cinétique sont les suivantes :

1° La vitesse de formation du complexe enzyme-substrat est beaucoup plus grande que la formation du produit de la réaction :

c'est l'hypothèse générale de validité des équations de Michaelis et Menten.

2° Le nombre des molécules de substrat, des activateurs et des inhibiteurs est toujours très grand par rapport au nombre de

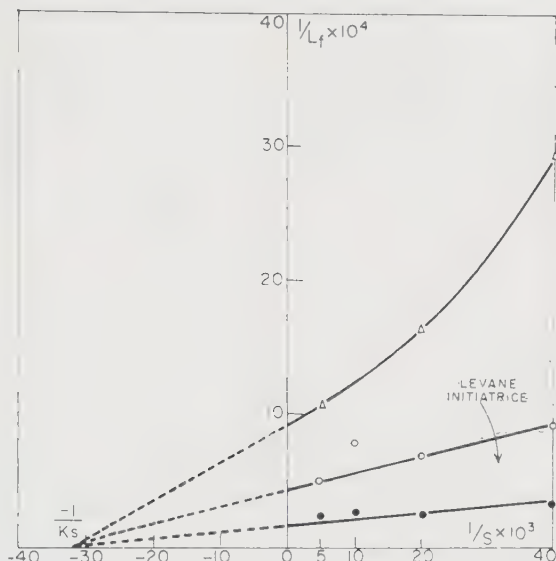


FIGURE 16. — Cinétique de l'activité de la lévane-sucrase.
Représentation de Lineweaver et Burk

II. — FORMATION DE LA LÉVANE

Abscisses : Inverse de la concentration du saccharose (évaluée en grammes par litre).

Ordonnées : Inverse de la quantité de lévane formée par une réaction de 3 minutes. Concentration de la lévane évaluée en imp. minute.

La flèche représente le sens de variation de la concentration de lévane précurseur, maintenue constante sur chaque droite du réseau (tableau VI).

molécules d'enzyme. C'est une hypothèse raisonnable dans notre cas si nous considérons que nous allons essayer :

a) de calculer la constante d'affinité enzyme-saccharose donneur de fructosyl;

b) d'étudier la nature de l'inhibition de la formation du fructose et des triosides par la lévane de P.M. faible utilisée dans l'expérience précédente, et de l'activation de la formation de lévane, par la même lévane ajoutée initialement au milieu en expérience.

A. — Constante d'affinité enzyme-saccharose

L'équation de base est :



K_1 est la constante de Henri et Michaelis-Menten de la fixation du saccharose sur l'enzyme.

Si v est la vitesse de la réaction

V la vitesse maxima en présence d'un excès de substrat,

S la concentration en saccharose

L'équation classique de Lineweaver et Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_1}{V} \left(\frac{1}{S} + \frac{1}{K_1} \right)$$

doit donner un réseau de droites, en portant en ordonnées $\frac{1}{v}$, et en abscisses $\frac{1}{S}$, chaque droite étant établie à valeur constante de la concentration en lévane initiale.

v peut être la vitesse de formation du fructose libre (fig. 15), ou la vitesse de formation de la lévane (fig. 16). Les valeurs expérimentales de v sont tirées du tableau VI; S est dans les deux cas la concentration initiale du saccharose, dont on supposera que les variations restent négligeables au cours de l'expérience. Cette hypothèse est valable pour les concentrations élevées de saccharose initial, où 5 % seulement du saccharose sont transformés en produits de la réaction. Dans le cas le plus défavorable, 20 % seulement du saccharose sont transformés par l'activité de l'enzyme (5.000 impulsions sur 25.000 impulsions dans le saccharose).

Le réseau de la figure 15 obtenu en portant les valeurs de $1/(\text{Fructose})$, en fonction de $1/(\text{Saccharose})$ converge sur l'axe des x en $-1/K_1$, et donne

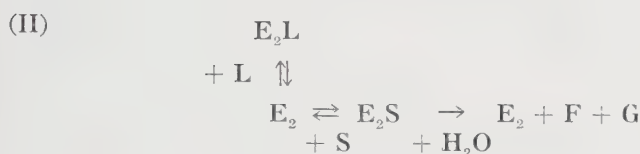
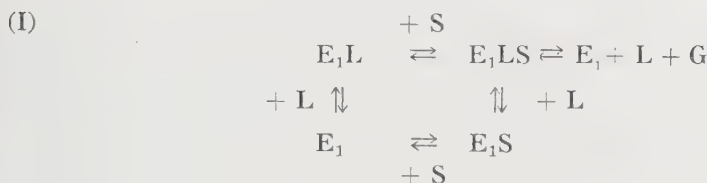
$$K_1 = 9,7 \cdot 10^{-2} \text{ M (pH 6,2, } t^\circ = 37^\circ).$$

Le réseau de la figure 16 obtenu en portant $1/(\text{Lévane formée})$ en fonction de $1/(\text{Saccharose initial})$ converge de même sur l'axe des x en $-1/K_1$, et donne :

$$K_1 = 9,15 \cdot 10^{-2} \text{ M (pH 6,2, } t^\circ = 37^\circ).$$

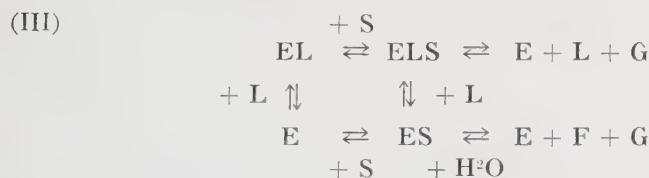
D'après Segal et ses collaborateurs [122], et Friedenwald et Maengwyn-Davies [57], les réseaux précédents peuvent s'interpré-

ter en supposant que la lévane précurseur agit comme inhibiteur non compétitif dans le cas de la formation du fructose, et comme activateur non couplé dans le cas de la formation de la lévane, suivant les schémas : (I) et (II)



où L est la lévane, S le saccharose, F le fructose, et G le glucose.

La proximité des valeurs de K_1 tirées des représentations graphiques des figures apportent un bon argument en faveur de l'identité des enzymes E_1 et E_2 dans les schémas I et II, ce qui permettrait de les réunir sous la forme III



B. — Constante d'affinité enzyme-lévane

A l'appui de cette hypothèse, on peut représenter, suivant Lineweaver et Burk (fig. 17 A) :

1° $1/(\text{fructose formé})$ en fonction de la lévane initiale considérée comme inhibiteur. On obtient un réseau dont l'intersection avec l'axe des x donne $-K_L$ (122), constante de dissociation du complexe enzyme-lévane :

$$K_L = 10 \cdot 10^{-3} \text{ M (pH 6,2, } t^\circ = 37^\circ)$$

On obtient la même valeur de K_L (fig. 17 B) en considérant la lévane initiale comme inhibiteur de la formation du trioside. On

porte alors $1/(\text{trioside})$, en fonction de la concentration en lévane initiale. On obtient un réseau coupant l'axe des x en $-K_L$. On obtient :

$$K_L = 10,9 \cdot 10^{-3} \text{ M (pH 6,2, } t = 37^\circ)$$

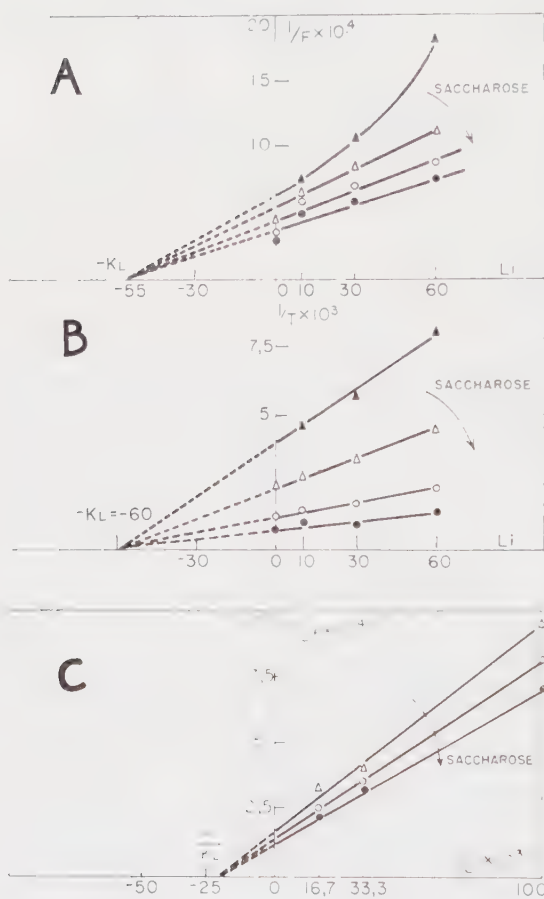


FIG. 17. — Cinétique de l'activité de la lévane-sucrase.

Représentation de Lineweaver et Burk

III. — EFFET D'ACTIVATION ET D'INHIBITION DE LA LÉVANE PRÉCURSEUR

Réseau A : Inhibition de la formation de fructose libre.

Abscisses : Concentration de la lévane précurseur (exprimée en grammes par litre).

Ordonnées : Inverse de la quantité de fructose formé en 3 minutes (unités de la figure 15).

La concentration de saccharose varie dans le sens indiqué par la flèche, elle est maintenue constante sur chaque droite du réseau.

Réseau B : Inhibition de la formation du trioside.

Abscisses : id. au réseau A.

Ordonnées : Inverse de la quantité de trioside formée en 3 minutes (unités de la figure 15).

La concentration de saccharose varie comme pour le réseau A.

Réseau C : Activation de la formation de lévane.

Abscisses : Inverse de la concentration en lévane précurseur exprimée en grammes par litre.

Ordonnées : Inverse de la quantité de lévane formée en 3 minutes (unités de la figure 15).

La concentration de saccharose varie suivant la flèche, comme pour les réseaux A et B.

De même, l'activation de la formation de lévane par la lévane précurseur peut être représentée par cette méthode (fig. 17 C) en portant $1/\text{lévane}$ formée en fonction de $1/\text{lévane}$ initiale. On

obtient un réseau dont l'intersection avec l'axe des x donne le point $-1/K_L$. La valeur numérique obtenue est, dans ce cas :

$$K_L = 8,2 \cdot 10^{-3} M$$

dans les mêmes conditions expérimentales.

Les valeurs précédentes de K_L , très voisines, d'après les trois modes de calcul précédents, peuvent être considérées comme identiques, dans la limite de précision de mes expériences.

Elles apportent la preuve que la lévane possède un emplacement spécifique sur l'enzyme, et confirment la validité des schémas I, II, III.

C. — Affinité enzyme-saccharose accepteur

Le saccharose joue un rôle double dans l'expérience précédente. Il agit comme donateur de fructosyl, mais la formation d'oligosides prouve qu'il est capable d'accepter le fructosyl. Il convient d'examiner si la molécule de saccharose-accepteur possède une affinité spécifique pour l'enzyme.

Dans ce cas, les équations de base deviennent :

Si E est l'enzyme libre

ES le complexe enzyme-saccharose donateur de fructosyl

SE le complexe hypothétique enzyme-saccharose-accepteur

SES le complexe complémentaire saccharose-accepteur-enzyme-saccharose donateur :

$$(1) E + S \xrightleftharpoons{K_1} ES \quad E = \frac{ES K_1}{S} = \frac{SES K_1 K_3}{S_2}$$

$$(2) S + E \xrightleftharpoons{K_2} SE \quad E = \frac{SE K}{S} = \frac{SES K_2 K_4}{S_2}$$

$$(3) ES + S \xrightleftharpoons{K_3} SES \quad ES = \frac{SES K_3}{S}$$

$$(4) SE + S \xrightleftharpoons{K_4} SES \quad SE = \frac{SES K_4}{S}$$

L'état final et initial étant le même, on a :

$$(5) \quad K_1 K_3 = K_2 K_4$$

et

$$K_3 = \alpha K_2, \quad K_4 = \alpha K_1$$

L'enzyme total étant Et, on a :

$$(6) \quad Et = E + ES + SE + SES$$

$$(7) \quad Et = SES \left(\frac{\alpha K_1 K_2}{S^2} + \frac{\alpha(K_1 + K_2)}{S} + 1 \right)$$

Si $\frac{\alpha K_1 K_2}{S^2} \ll \frac{\alpha(K_1 + K_2)}{S}$, nous pourrions négliger le terme de second ordre, et le tracé de Lineweaver et Burk sera linéaire. Le réseau expérimental devra converger en un point de l'axe des x .

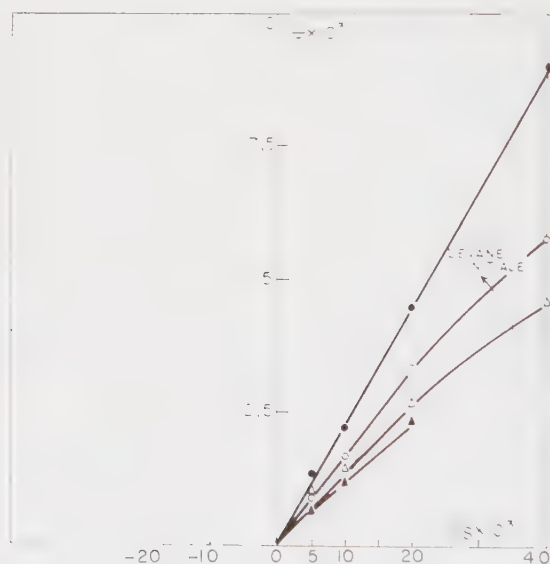


FIGURE 18. — Cinétique de l'activité de la lévane-sucrase.
Représentation de Lineweaver et Burk

IV. — FORMATION DU TRIOSIDE

Abscisses : Inverse de la concentration en saccharose (exprimée en grammes par litre).

Ordonnées : Inverse de la quantité de trioside formé en 3 minutes (unités de la figure 15).

La flèche représente le sens de variation de la concentration en lévane précurseur, maintenue constante sur chaque droite du réseau.

Trois cas se présentent ainsi suivant le tableau ci-dessous :

	CONDITION DE LINÉARITÉ DU TRACÉ DE L. ET B.	INTERSECTION AVEC L'AXE DES x
Cas général	$\frac{K_1 K_2}{K_1 + K_2} \ll S$	$\frac{-1}{\alpha (K_1 + K_2)}$
N° 1) $K_1 \ll K_2$..	$K_1 \ll S$	$\frac{-1}{\alpha K_2}$
N° 2) $K_1 \gg K_2$..	$K_2 \ll S$ donc, <i>a fortiori</i> $K_1 \ll S$	$\frac{-1}{\alpha K_1}$
N° 3) $K_1 \# K_2$..	$K_1 \ll 2 S$	$\frac{-1}{2 \alpha K_0}$

Nous savons que pour les points du tracé expérimental les plus près de l'origine de abscisses, on a bien $K_1 \ll S$, la condition de linéarité est remplie. Le tracé de la figure 20 donne une convergence du réseau en un point très proche de l'origine, ou confondu avec l'origine dans la limite des erreurs expérimentales.

Ceci permet de conclure, connaissant $K_1 \# 9.10^{-2} M$

$$\alpha(K_1 + K_2) \gg 9.10^{-2} M$$

ce qui entraîne, soit $\alpha \gg 1$

soit K_2 tend vers l'infini

De toute façon, $K_3 = \alpha K_2$ tend vers l'infini.

Ceci indique que le saccharose accepteur n'a pas d'affinité ou possède une affinité très faible pour le complexe enzyme-donateur.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

I. — UNICITE OU MULTIPLICITE DES FACTEURS DANS LES EXTRAITS ENZYMATIQUES

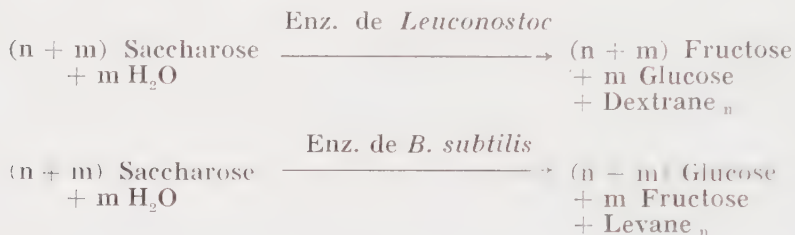
Constatons d'abord que les extraits enzymatiques capables d'effectuer la synthèse de la lévane à partir du saccharose, produisent toujours en même temps que le polyoside et le glucose, du fructose libre [58], et des oligosides [39, 50]. Deux hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène. Suivant l'une, celle de Hestrin et ses collaborateurs [5, 80], travaillant avec des extraits d'*Aerobacter levanicum*, un seul enzyme est responsable de la production du polyoside et du fructose. Suivant l'autre, due à Forsyth et Webley [56] qui ont étudié la formation des lévanes par *B. megatherium*, il existe une invertase mélangée au facteur synthétisant. Mattoon et ses collaborateurs [101] ajoutent à cette dernière hypothèse, celle de l'existence d'un troisième facteur : la lévanease hydrolysant le polyoside formé par la lévane-sucrase.

Remarquons qu'aucune de ces hypothèses n'est appuyée sur une base expérimentale suffisante : les auteurs précédents ont travaillé avec des bactéries entières, ou des extraits non purifiés, contenant sûrement dans certains cas [56, 101], probablement dans d'autres [5], une quantité notable mais variable de lévane préformée. Mes expériences ont montré que le polyoside précurseur est capable, par sa présence ou son absence, de modifier considérablement le bilan des produits de la réaction de l'extrait sur le saccharose, ce qui fausse les analyses faites sans tenir compte de ce phénomène.

D'autre part, j'ai fait remarquer dans l'historique que l'hydro-

lyse du substrat de type R- β -fructofuranosyl par les invertases se présente comme un cas particulier du transfert de β -fructosyl [48] et que la synthèse d'oligosides et l'hydrolyse sont des phénomènes dus au même facteur enzymatique [52].

Forsyth et Webley [55, 56] ont montré que l'activité de la dextrane sucrase brute de *Leuconostoc mesenteroides* donne naissance à du glucose libre. La situation est parallèle à celle observée avec la lévane-sucrase :



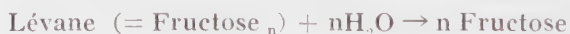
Forsyth et Webley supposent que les bactéries entières, ou les extraits bruts employés contiennent une invertase, mais ils ne l'ont pas démontré. Il est difficile de conclure à l'existence d'un ou plusieurs facteurs distincts dans les extraits bruts.

J'examinerai les hypothèses de l'unicité ou de la multiplicité des facteurs enzymatiques à la lumière des expériences que j'ai décrites dans le chapitre III et qui sont faites sur des extraits purifiés et exempts de polyoside.

a) Problème de l'existence d'une lévanease

Nous pouvons exclure d'emblée l'hypothèse de l'existence d'une « lévanease » dans l'extrait purifié qui est sans action sur le polyoside employé seul comme substrat. Mais, la réaction étant réversible, on peut s'attendre à trouver, en présence de glucose, de lévane et d'extrait enzymatique, d'abord du saccharose, puis une petite quantité de fructose formé par hydrolyse du saccharose.

C'est bien ce qui apparaît d'après mes expériences et qui pouvait faire croire à la possibilité d'une hydrolyse directe de la lévane. Nous pouvons conclure que la réaction :



est impossible en présence de lévane-sucrase purifiée, en dehors de la présence de glucose ou d'un des aldoses actifs spécifiés au chapitre III, tableau IV.

b) *Problème de l'existence d'une invertase*

L'absence, dans les extraits enzymatiques, que j'ai préparés, d'une β -fructo-furanosylase n'ayant sur le saccharose qu'une action hydrolysante m'a paru d'abord difficile à démontrer. J'ai montré que le rapport lévane/fructose formés ne varie pas en fonction du pH de la réaction. Les essais d'inactivation sélective par la chaleur [101] ne donnent pas de résultats concluants.

L'électrophorèse sur gélose de l'enzyme purifié ne m'a jamais donné deux pics distincts d'activité : la formation de sucre réducteur s'accompagne toujours de synthèse de lévane.

Cependant, ces considérations sont insuffisantes pour apporter une conclusion au problème. La preuve de l'identité du facteur hydrolysant avec le facteur transférant est donnée par la démonstration du rôle joué par la lévane, dans l'activation de sa propre synthèse et l'inhibition de la formation du fructose libre.

Les deux effets sont en corrélation, mais l'étude qualitative du phénomène permettait de supposer qu'il s'agissait de deux réactions distinctes et que le polyside était un inhibiteur d'un facteur purement hydrolysant et activateur d'un facteur synthétisant distinct : la lévane-sucrase proprement dite.

L'étude de la cinétique de la réaction montre qu'en réalité, les constantes de dissociation de la lévane, avec les deux facteurs hypothétiques, sont, dans mes conditions expérimentales, très voisines de $K_L = 10 \cdot 10^{-3}$ M. Ces mesures permettent d'affirmer raisonnablement, non pas qu'il n'existe pas de facteur hydrolytique distinct dans certains extraits bruts, mais que la trans- β -fructofuranosylase que j'ai purifiée possède aussi un pouvoir hydrolytique qui rend compte de la formation du fructose libre.

L'hypothèse de l'existence d'une invertase distincte des sucrares transférantes n'est pas non plus nécessaire pour rendre compte des résultats obtenus par d'autres auteurs, avec des cellules ou des préparations non purifiées d'organismes variés, synthétisant des lévanes ou des dextranes, comme *Bacillus subtilis*, *Aerobacter levanicum*, *Bacillus megatherium*, *Phytomonas* ou *Leuconostoc mesenteroides*. Une telle invertase inhiberait du reste fortement, si elle existait, la synthèse du polyside, et permettrait sa disparition rapide des milieux en incubation, ce qui n'est pas le cas.

c) *Problème de l'existence de trans- β -fructofuranosylases distinctes de la lévane-sucrase*

L'existence indépendante du ou des facteurs responsables de la formation des oligosides se trouve aussi en question.

L'effet inhibiteur de la lévane précurseur sur la synthèse de toute la chaîne des oligosides apparaît sur mes chromatogrammes, et la cinétique de la réaction montre que la constante de dissociation de la lévane avec l'enzyme formateur du trioside, est identique à la constante de dissociation lévane/sucrase/lévane. Le raisonnement est alors le même que celui qui se rapporte à la formation du fructose libre.

Il existe donc une très grande présomption pour que ces facteurs transférants soient, en réalité, un seul et même enzyme, dont il convient de connaître le mode d'action en détail pour expliquer la formation de ces divers produits.

d) Problème des facteurs de ramification

Dans ce qui précède, nous n'avons pas examiné l'hypothèse de l'existence d'un facteur distinct responsable de la formation des ramifications de la molécule de lévane. En effet, il faut tenir compte de l'existence de points de branchement, à liaison 1-2, entre les résidus fructosyl, à côté des liaisons 2-6 dans les chaînes principales de la lévane.

Comme je l'ai dit au début de ce travail, la preuve de l'existence d'un tel facteur suppose une étude complète de la structure de la lévane de synthèse, qui n'a pas été entreprise ici.

On ne peut donc affirmer ou nier l'existence d'un ou de plusieurs facteurs de ramification dans les extraits que j'ai préparés, purifiés ou non. Quelques remarques peuvent néanmoins être faites à ce sujet.

Tout d'abord, au cours des expériences de synthèse enzymatique que j'ai faites en présence ou en l'absence de lévane précurseur, je n'ai observé aucune variation significative de l'opacité relative des lévanes formées dans chaque expérience (fig. 13), non plus que dans les témoins contenant l'extrait enzymatique et la lévane initiatrice, sans saccharose. On devrait s'attendre à observer une telle variation, en présence d'un facteur de branchement spécial, si on admet que le degré de ramification des molécules de lévane est en relation avec leur opacité. Ceci conduit à admettre que les molécules de lévane une fois formées ne peuvent plus être ramifiées ultérieurement et restent stables. Ceci rend difficile de comprendre comment pourrait agir l'enzyme de ramification.

D'autre part, j'ai démontré par l'étude cinétique de la réaction, que le saccharose est un accepteur non spécifique de fructosyl lié à l'enzyme. Il est possible de penser que la fixation de fructosyl par le saccharose n'est pas liée à la structure « fructofuranosyl » de l'accepteur, et que d'autres accepteurs peuvent également rece-

voir le fructosyl. C'est, nous le savons, le cas de l'eau. La formation d'oligosides observée par Dedonder et Noblesse [39] en présence de saccharose et d'une concentration élevée de glucose, me paraît correspondre à une fixation de fructosyl sur le glucose, qu'il faut distinguer de la formation spécifique du saccharose par réversibilité de la réaction de synthèse de la lévane. On aurait ainsi un phénomène analogue à celui observé avec l'invertase de levure, capable de fixer du fructosyl sur un accepteur de formule générale $R-CH_2OH$.

Or, il existe, sur les atomes de carbone 1 des résidus fructosyl de la lévane, des fonctions $-CH_2OH$, libres sur les chaînes.

Si ces fonctions peuvent fixer le fructosyl, non spécifiquement, comme le fixent l'eau, le saccharose ou le glucose, la formation de ramifications se trouverait expliquée sans faire appel à un facteur distinct.

Je me contenterai de ces quelques remarques, sans prétendre donner une réponse au problème de l'existence de facteurs de ramification dans ces extraits enzymatiques.

II. — PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DE L'ENZYME

La structure de la lévane-sucrase paraît être de même type que celle d'enzymes analogues, comme la dextrane-sucrase ou les invertases, pour lesquelles on ne connaît aucun coenzyme dissociable. Le degré de purification par rapport à l'azote protéique de mes extraits m'a semblé encore insuffisant (Pureté = 24 fois celle de l'extrait brut) pour tenter une analyse chimique. La dialyse prolongée en l'absence de phosphate n'inactive pas l'enzyme. La réaction n'est certainement pas phosphorolytique. Il est à remarquer que, comme dans le cas de l'invertase de levure [52], on éprouve la plus grande difficulté à séparer l'enzyme des polysides auxquels il est lié, comme je l'ai démontré. Dans le cas de la lévane, cette liaison est spécifique. La mesure expérimentale de la constante de dissociation donne des valeurs comprises entre 8,2 et 10,9 $10^{-3}M^*$. On observe une fragilité accrue de la protéine enzyme et une perte d'activité considérable par élimination du polyside (tableau II). L'enzyme se lie d'ailleurs avec d'autres polysides dont on le sépare difficilement, tels l'amidon, ou la gélose; il s'adsorbe également avec énergie sur un substrat inerte à grande surface, comme l'Hyflo-Super-Cel.

* L'identité de la liaison enzyme-lévane reconnue par des méthodes cinétiques, et de la liaison reconnue par des méthodes chimiques, reste sujette à caution.

L'enzyme de *Bacillus subtilis* possède le même pH optimum d'activité que celui d'*Aerobacter levanicum* [80] : 5,8 environ. La constante de Henri et Michaelis-Menten vis-à-vis du saccharose donateur de fructosyl est $K_s = 9 \cdot 10^{-2}$ M, elle est relativement élevée, plus élevée en particulier que celle de l'invertase de levure ($K_s = 1,6 \cdot 10^{-2}$ M) [102] ou de la phosphorylase de muscle ($K_s = 0,57 \cdot 10^{-2}$ M) [34].

Sa mobilité électrophorétique permet de calculer son point isoélectrique qui se trouve au voisinage de pH 4,0 (tampon acétate $\mu = 0,05$), ce qui laisse prévoir une teneur élevée en fonctions acides libres dans la protéine enzyme.

Une préparation très purifiée, en quantité plus importante, sera nécessaire pour étudier plus à fond la structure chimique de l'enzyme.

III. — MECANISME DE LA REACTION

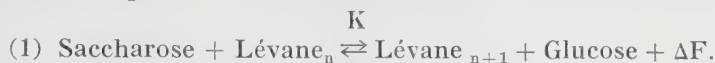
Doudoroff et O'Neal [47] ont donné une présomption de la réversibilité de la réaction conduisant à la synthèse de lévane à partir du saccharose, en déplaçant par addition d'invertase l'équilibre de la réaction 1, vers la droite, c'est-à-dire vers la dégradation de la lévane. Les résultats expérimentaux de ces auteurs sont en désaccord avec ceux de Hestrin et ses collaborateurs [80], et ne paraissent pas entièrement probants. Mais ces expériences sont confirmées, comme je l'ai montré, par la synthèse enzymatique du saccharose et de ses analogues au moyen de lévane-sucrase. La mesure des concentrations du saccharose formé en fonction du temps, montre que cette concentration augmente d'abord jusqu'à un palier, puis diminue pour se stabiliser ensuite à un niveau inférieur (courbes 10).

L'existence d'un tel maximum peut se justifier de plusieurs manières. Ceci peut provenir de la formation secondaire de fructose libre et d'oligosides dans le stade de la réaction correspondant à la partie descendante des courbes 10. Nous avons vu qu'on observe effectivement une tache de fructose à la fin de l'expérience, en présence d'extrait enzymatique, de lévane et de glucose.

Ceci peut provenir aussi de la formation de lévane très polymérisée : cette formation ne modifierait pas l'équilibre de la réaction, mais diminuerait la vitesse de la réaction élémentaire par rapport aux réactions latérales. Les deux processus peuvent intervenir en même temps et fournir une explication de l'aspect

des courbes 15. On ne peut cependant donner de ces courbes une interprétation quantitative.

Nous pouvons conclure que seule la partie ascendante correspond à l'écriture simplifiée de la réaction sous la forme :



A l'équilibre, on aurait, suivant l'équation ci-dessus :

$$K = \frac{(\text{Lévane}_n) \times (\text{Saccharose})}{(\text{Lévane}_{n+1}) \times (\text{Glucose})}$$

et, le nombre de résidus terminaux fructosyl actifs dans les molécules de lévane, étant constant dans la réaction 1 :

$$K = \frac{(\text{Saccharose})}{(\text{Glucose})}$$

En adoptant le maximum des courbes 15 comme correspondant à l'équilibre suivant l'équation 1, on aurait :

$$K = \frac{6,5}{93,5} \times \frac{180}{342} = 3,66 \cdot 10^{-2} \text{ à } 37^\circ, \text{ pH } 6,2$$

6,5 = concentration maxima observée de saccharose en g.p.l.

93,5 = concentration de glucose en réaction (mêmes unités).

180 P.M. du glucose.

342 P.M. du saccharose.

Cette valeur de K donne, pour la réaction 1 :

$$\Delta F = - R T \text{ Log } K = 2\,040 \text{ cal.}$$

En adoptant pour l'énergie interne de liaison diosidique du saccharose la valeur 6.600 cal. [69], nous aurons pour l'énergie interne de la liaison fructofuranosyl — 2-6-fructofuranose dans la lévane, la valeur :

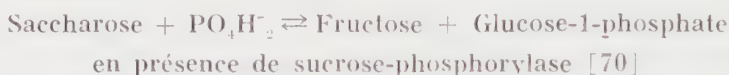
$$6.600 - 2.040 = 4.560 \text{ cal.}$$

Le même calcul, effectué pour la valeur de K correspondant à l'équilibre atteint dans la portion terminale des courbes 10 donnerait la valeur 3.700 calories pour l'énergie interne de liaison dans la lévane. Cette dernière mesure ne peut être donnée que sous toute réserve quant à la validité des hypothèses de base et sans tenir compte des réactions latérales. De toute manière, on peut conclure de ces expériences que l'énergie de liaison osidique dans la lévane est voisine de 4.000 calories.

Cette valeur est intermédiaire à celles admises pour l'énergie

de liaison C—O—P du glucose-1-phosphate (4.800 cal.), et la liaison osidique du maltose (3.900 cal.).

La valeur de la constante d'équilibre $K = 3,7 \cdot 10^{-2}$ est voisine de celle ($K = 5 \cdot 10^{-2}$) donnée par Doudoroff et ses collaborateurs pour l'équilibre :



J'ai démontré que la lévane-sucrase était capable d'effectuer la synthèse de β -fructofuranosyl-aldosides analogues du saccharose, dans lesquels le glucose était remplacé par le D-galactose, le D-xylose, ou le L-arabinose, et que les seuls oses substrats devaient posséder la même structure que le glucose sur les carbones 2 et 3 adjacents au carbone semi-acétalique du D-glucose suivant le schéma :



Position spécifique
des oxhydriles.

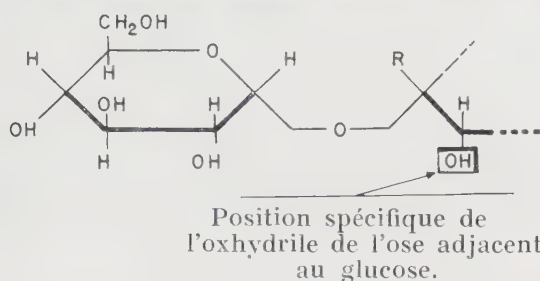
Le radical R- lié au fructofuranosyl par une liaison semi-acétalique peut être, soit un aldose dont la spécificité stérique vient d'être définie, soit un aldoside comme le mélibiose qui possède la même structure dans sa molécule.

Les mêmes analogues du saccharose peuvent être synthétisés par l'enzyme d'*Aerobacter levanicum*, comme l'ont montré Hestrin et ses collaborateurs [81] par des expériences effectuées indépendamment des nôtres. La structure du xylo-fructoside a été étudiée en détail par ces auteurs [4], qui ont établi que sa constitution correspond bien à celle que mes expériences avaient prévue (fig. 12).

Cette identité de spécificité stérique des substrats des enzymes de *B. subtilis* et d'*Aerobacter* apporte une intéressante confirmation à mon travail, et montre que ces deux enzymes sont très analogues ou identiques.

Des analogues du saccharose peuvent aussi être synthétisés par l'action de la sucrose-phosphorylase de *Pseudomonas saccharophila* [70]. Dans ce cas, c'est le cétose qui varie, le fructofura-

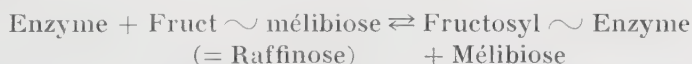
nose pouvant être remplacé par le xylocétose, le sorbose et d'autres oses. Il existe aussi, dans ce cas, une spécificité stérique pour le cétose, très analogue à celle de la lévane-sucrase, mais moins rigoureuse, et figurée de la manière suivante par Gottschalk [61].



Comme le glucose est, en même temps, un inhibiteur compétitif de la formation de la lévane par la lévane-sucrase, on peut conclure des considérations qui précèdent que l'enzyme possède un emplacement spécifique, actif, capable de fixer réversiblement le saccharose et ses analogues structuraux.

Cette liaison correspond à l'existence d'un complexe labile enzyme-R-O-2-β-fructofuranosyl dont la constante de Henri et Michaelis-Menten est $9 \cdot 10^{-2}$ M, dans le cas où R- est l'α-glucopyranosyl.

Nous ignorons encore si l'enzyme possède une spécificité stricte ou lâche pour le fructofuranosyl; la réaction de synthèse du fructofuranosyl-β-2-1-α-xyloside, effectuée par Avigad et ses collaborateurs, à partir du raffinose [4] avec un extrait d'*Aerobacter*, s'écrit suivant ses auteurs :



~ représente l'énergie de liaison osidique supposée conservée dans la liaison enzyme-substrat.

Ceci implique l'existence d'une liaison fructosyl ~ enzyme spécifique : en réalité, il se forme aussi de la lévane et du fructose libre en même temps que se produit la réaction d'échange précédente et il n'est pas sûr que le xylo-fructoside ne se forme pas comme dans la réaction réversible décrite au chapitre III.



Il faut remarquer aussi que, s'il existait un complexe Fructosyl $\sim$ Enzyme, comme la synthèse de lévane est réversible, on devrait avoir :

- 1) Lévane_n + Enzyme $\rightleftharpoons$ Lévane_{n-1} + Fructosyl $\sim$ Enzyme.
- 2) Fructosyl $\sim$ Enzyme + H₂O $\rightarrow$ Fructose + Enzyme.

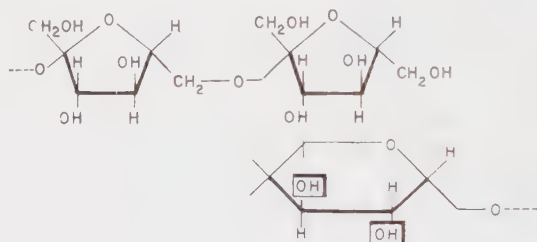
La somme des équations 1 + 2 donnerait :



J'ai démontré qu'on n'observait pas la réaction 3, ce qui rend improbable l'existence d'un complexe Enzyme $\sim$ Fructosyl.

* .

Comme conséquence de l'existence d'un complexe enzyme-saccharose, dont la spécificité stérique est bien définie, il m'a paru impossible de supposer que le dernier résidu fructofuranosyl de la lévane vienne occuper la place de l'aldose sur l'emplacement spécifique de l'enzyme.

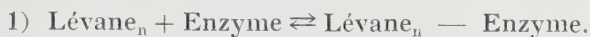


On voit, sur le schéma ci-dessus, qu'aucune position des oxhydriles du reste fructosyl terminal de la lévane ne coïncide avec la structure spécifique précédemment définie.

D'autre part, la constante de dissociation du complexe enzyme-lévane dont j'ai montré l'existence est environ 10 fois plus faible que la constante de dissociation du complexe enzyme-saccharose. Il faut en conclure que la lévane est capable de se fixer sur un emplacement distinct de celui du saccharose, et de former ainsi un complexe spécial.

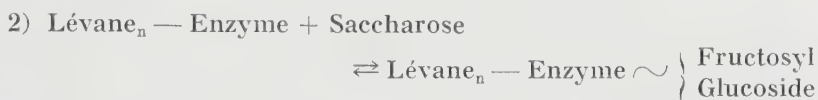
On peut alors donner des réactions de la lévane-sucrase l'interprétation suivante. Cette interprétation est fondée à la fois sur les données cinétiques établissant l'existence d'affinités entre les substrats et l'enzyme, et sur l'étude de la spécificité stérique des substrats, qui nous a donné des renseignements sur la structure des complexes ainsi formés.

1° *En présence de lévane*, l'enzyme peut se combiner réversiblement à ce polyoside, suivant la formule :



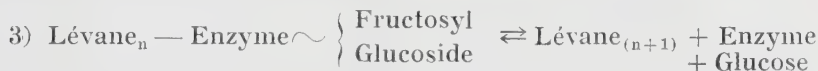
Nous connaissons la constante d'affinité du complexe ainsi formé, mais nous ignorons encore le mode de liaison des deux produits. Nous savons cependant qu'il est différent de la liaison de l'enzyme avec le saccharose.

Le complexe formé dans la réaction 1 se combine alors réversiblement avec un donateur spécifique de fructosyl, le saccharose par exemple :

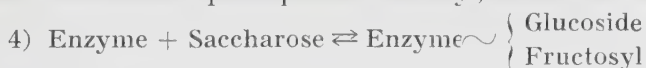


Nous connaissons une partie au moins de la spécificité stérique du complexe formé dans la réaction 2, et nous connaissons la constante d'affinité du saccharose avec le complexe enzyme — lévane.

Le fructosyl est alors transféré sur la molécule de lévane, avec libération simultanée du glucose : nous savons que cette troisième réaction est également réversible :

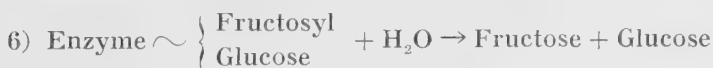
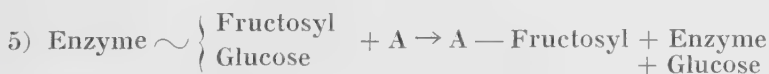


2° *En l'absence de polyoside accepteur*, l'enzyme peut réagir avec un donateur spécifique de fructosyl, suivant la réaction 4.



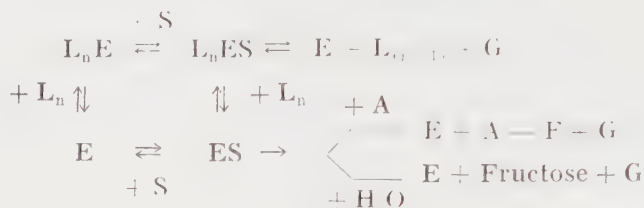
Dans ce cas, nous connaissons aussi la constante d'affinité de l'enzyme avec le saccharose donateur, qui est voisine de celle du complexe [lévane — enzyme] — saccharose donateur. C'est pourquoi il ne peut être certain que la réaction 1 précède ou suit la réaction 2. Dans les deux cas, il est à présumer que la spécificité stérique des réactions 2 et 4 est la même.

Le complexe formé dans la réaction 4 peut réagir avec un accepteur non spécifique ou avec l'eau, suivant les réactions 5 ou 6 :



Nous savons, dans le cas où A est le saccharose accepteur de fructosyl, que A n'a pas d'affinité pour l'enzyme, et nous ne possédons pas de preuve que la réaction 5 soit réversible; nous savons que la réaction 6 ne l'est pratiquement pas.

L'ensemble des réactions précédentes permet de compléter le schéma n° III du chapitre IV par le schéma suivant :



Dans ce schéma, L_n et L_{n+1} sont des molécules de lévane de degré de polymérisation n et $n+1$, S est le saccharose ou un analogue structural, F est le fructosyl, G le glucose, et A un accepteur non spécifique. Comme nous savons que le saccharose ne peut pas occuper l'emplacement spécifique de la lévane, pour lequel il ne possède pas d'affinité, on ne peut admettre qu'il se forme directement des molécules de lévane, sans adjonction de précurseur. Or, nous savons que même avec des préparations enzymatiques purifiées ne contenant pas de précurseur, il se forme un peu de lévane. Il faut en conclure, soit que ces préparations renferment un petit nombre de molécules de précurseur, ayant échappé à nos moyens analytiques, soit que le saccharose agissant comme accepteur non spécifique, il se formera d'abord des chaînes d'oligosides (produits A.F. du schéma précédent).

Or Whelan et Bailey [133] ont montré, dans le cas de la phosphorylase de pomme de terre, que le maltose n'était pas un précurseur de la chaîne d'amylose, mais que le maltotriose était déjà un précurseur et que l'effet du précurseur était maximum à partir du maltotétraose.

On peut former l'hypothèse qu'il en est ainsi dans le cas de la lévane-sucrase, et que les oligosides les plus longs sont déjà de bons précurseurs de la synthèse de lévane.

Dire d'autre part que le complexe enzyme-lévane est spécifique, c'est dire que l'emplacement de la lévane sur l'enzyme est bien déterminé. Ce complexe ne peut donc pas se déformer beaucoup, ce qui rend improbable la formation des liaisons $2 \rightarrow 1$, donnant des branches, par le même mécanisme que l'allongement des chaînes par des liaisons $2 \rightarrow 6$.

Le schéma précédent ne rend donc pas compte de la formation des branches.

Considérations générales

On voit apparaître en étudiant les diverses propriétés de la lévane-sucrase, des points de comparaison avec des transglycosidases variées, phosphorolytiques ou non.

1° *Substrat.* — Dans le cas de la lévane-sucrase, transférant le fructosyl, le substrat est le saccharose ou ses analogues structuraux.

Le saccharose est aussi le substrat d'autres transglycosidases; mais dans le cas de l'amylosucrase de *Neisseria perflava* [71], de la dextrane-sucrase de *Leuconostoc mesenteroides*, ou de la sucrose phosphorylase de *P. saccharophila* [44], c'est le reste α glucosyl qui est transféré de la molécule de saccharose à l'accepteur. Dans le cas de la sucrose phosphorylase, nous avons vu que les limitations stériques du radical glucidique lié au glycosyl transféré se rapprochent de celles de la lévane-sucrase. Pour tous les enzymes qui précèdent, l'activité du substrat semble être en relation avec la haute énergie de liaison diosidique du saccharose ou de ses analogues; cette énergie rend possible un transfert de glycosyl sur des liaisons de moindre énergie, avec un rendement acceptable et à des concentrations physiologiques de substrat.

Au contraire, tous les composés de type R-O- β -fructofuranosyl sont des substrats des invertases de levure et de moisissure [9]. Si on suppose que l'énergie de liaison est conservée dans les complexes enzyme-substrat, formés au contact des invertases, ces complexes auraient une énergie de liaison plus faible que les complexes formés par les enzymes spécifiques des structures « saccharose » ou « glucose-1-phosphate ». Ceci entraîne dans le cas des invertases une difficulté plus grande des réactions de transfert et une prédominance des réactions d'hydrolyse, ce que montre l'expérience.

Remarquons cependant qu'il pourrait se former avec l'invertase de moisissure, un complexe enzyme-saccharose analogue à celui que nous avons proposé dans le cas de la lévane-sucrase, mais de spécificité plus lâche. On aurait ainsi une explication aux possibilités d'échange de glucose dans la molécule de saccharose observée par Edelman en présence de cet enzyme [48]. On s'expliquerait également ainsi que les transferts de fructosyl sur des fonctions alcool secondaires liées à un reste osidique ou à une chaîne aliphatique, soient plus faciles avec l'invertase de moisissure qu'avec l'invertase de levure.

2° *Réversibilité.* — La réversibilité de la réaction est aussi un point d'analogie entre la lévane-sucrase et d'autres transglycosi-

dases. Dans le cas des réactions d'échange de glycosyl entre une chaîne polyosidique et l'ion PO_4 , la différence de niveau énergétique est relativement faible, c'est-à-dire que l'équilibre est réalisé en présence de concentrations de chaque constituant, facilement accessibles à l'expérience. Il en est de même dans le cas de la sucrose-phosphorylase où l'échange est réalisé entre le saccharose et le phosphate, avec une perte d'énergie $\Delta F = -1\,800$ cal. [70]. Au contraire, la perte d'énergie est plus élevée dans le cas du transfert de l' α -glucosyl ou du β -fructosyl du saccharose sur des hauts polymères, où la fonction pseudo-acétalique du radical transféré est liée à un carbinol primaire ou secondaire du chaînon précédent. C'est ainsi qu'on n'a pas pu démontrer que la formation de dextrane soit réversible, ce qui ne doit pas surprendre puisque l'énergie de liaison α -glucosyl 1 $\rightarrow$ 6 glucose paraît particulièrement faible [89]. Dans le cas de l'amylosucrase [71 b] et de la lévane-sucrase, la réaction est réversible, mais la concentration de saccharose en équilibre avec les autres constituants est toujours très petite.

D'autre part, cette possibilité de réversibilité paraît en relation avec l'existence de complexes enzyme-substrat à haute énergie, donc, d'après ce que nous venons de voir, avec un degré élevé de spécificité vis-à-vis des radicaux liés au glycosyl transféré.

3° *Hydrolyse du substrat.* — La lévane-sucrase peut, au moins partiellement, hydrolyser son substrat. Il en est de même de la dextrane-sucrase [56] et des invertases.

Cette propriété hydrolytique est celle d'enzymes qui peuvent en même temps synthétiser des oligosides. Elle dépend apparemment des possibilités d'accès d'accepteurs non spécifiques de glycosyl, au complexe enzyme-substrat. Nous ne savons cependant pas pourquoi ces accepteurs peuvent accéder à l'emplacement actif de certains enzymes, et pas des autres. Remarquons cependant que dans le cas où on n'observe pas d'hydrolyse, l'accepteur est l'ion PO_4 et que cet ion peut être remplacé par l'ion AsO_4 (Arseniolyse).

4° *Synthèse de hauts polymères.* — A titre d'hypothèse de travail, il semble justifié de supposer que la possibilité de synthèse de hauts polymères n'est pas liée à la synthèse d'oligosides. En d'autres termes, les hauts polymères ne résultent pas de l'allongement direct des oligosides par un mécanisme unique. La seule exception à cette règle semble être l'amylomaltase d'*E. coli* [103 b], mais même dans ce cas, nous ne sommes pas sûrs que les oligosides se forment par le même mécanisme que le haut polymère. Dans le cas de la lévane-sucrase, la synthèse des oligosides est due à un mécanisme distinct de la synthèse du polyoside; il n'y a pas

d'oligosides formés par les phosphorylases, et les invertases ne donnent que des oligosides.

On constate expérimentalement que la synthèse de hauts polymères se fait à partir de petites molécules, à énergie de liaison élevée, oses-phosphates ou saccharose. Le transfert peut aussi s'effectuer d'un polymère à un autre comme dans le cas du Q enzyme ou de la dextrane-dextrinase de Hehre [73 b].

On a démontré, dans nombre de cas, que le haut polymère se forme par allongement d'un précurseur spécifique et on peut prévoir que ce résultat prendra la valeur d'une règle.

Lorsque la réaction de polymérisation est réversible, on peut écrire si P_N est le polymère de degré de polymérisation N et P_{N-1} le polymère de rang inférieur :

$$\frac{P_N}{P_{N-1}} = K \quad 1$$

Si l'affinité de l'enzyme pour P ne varie pas avec N , c'est-à-dire s'il ne se forme pas de combinaison spécifique enzyme-polymère, K ne varie pas en fonction de N et la concentration de P_N diminue exponentiellement quand N augmente.

C'est bien ce qui se passe avec les invertases, avec lesquelles on n'a pas observé de transfert conduisant plus loin que le penta-ose. Des résultats analogues ont été obtenus par Dedonder avec l'inulosucrase de *tige* de topinambour [37].

Il faut donc supposer que la possibilité de transfert du glycosyl sur la molécule du polymère inférieur, varie avec le degré de polymérisation et par conséquent que les très hauts polymères se forment dans le cas où il existe une forte affinité spécifique entre le haut polymère et l'enzyme.

Un autre argument à l'appui de cette manière de voir peut être trouvé dans le fait que les chaînes des polyosides formés enzymatiquement possèdent un mode de liaison parfaitement déterminé, alors que des oligosides à liaison osidiques variées peuvent être formés par le même enzyme [4, 39, 50]. On peut en conclure d'une façon probable dans le cas de la lévane-sucrase, et tenter de vérifier dans le cas des autres transglycosylases, que seule l'existence d'un complexe précurseur explique à la fois, la structure spécifique du haut polymère, son poids moléculaire très élevé, et le bon rendement de la réaction qui lui donne naissance, par rapport aux réactions latérales.

5° *Existence de réactions d'échange.* — Dans le cas où le complexe hypothétique enzyme-glycosyl est formé à partir d'un dona-

teur à haute énergie, on observe des réactions d'échange entre deux radicaux R et R' liés alternativement au glycosyl échangé, avec conservation de l'énergie de liaison. Ces réactions d'échange peuvent se faire, tantôt en l'absence de l'accepteur, tantôt en sa présence seulement. C'est ainsi que la sucrose phosphorylase peut réaliser l'échange de radicaux liés au glycosyl en présence ou en l'absence de phosphate minéral accepteur. Le cas de l'échange de glucose dans la molécule de saccharose par l'invertase de moisissure est probablement analogue [48]. Au contraire, la phosphorylase de pomme de terre ne peut échanger de glucosyl qu'en présence de phosphate. Il s'agit, dans ce cas, d'un double transfert plutôt que d'un échange vrai [69].

Hestrin et ses collaborateurs pensent que la lévane-sucrase est capable de réaliser des échanges vrais en l'absence d'accepteur [4]. J'ai montré plus haut que les expériences de ces auteurs ne paraissent pas confirmer ce fait sans équivoque.

Tous ces phénomènes de transfert peuvent s'interpréter en supposant que dans les cas où l'échange n'est possible qu'en présence d'accepteur, il se forme un complexe double réversible accepteur-enzyme-donateur, alors qu'il n'existe qu'un complexe enzyme-glycosyl dans le cas où l'échange est possible en l'absence d'accepteur.

C'est à cette conclusion qu'ont abouti Fitting et Doudoroff en comparant les propriétés de la sucrose-phosphorylase et de la maltose-phosphorylase [53 b].

6° *Structure des transglycosylases.* — J'ai signalé dans l'introduction de ce travail, à quelles difficultés se heurtaient l'étude de la structure des enzymes de cette catégorie. Il est certain que la découverte de coenzymes de nature nucléotidique, transporteurs de glycosyl dans quelques systèmes enzymatiques des plantes supérieures et des animaux [24, 47 b, 96, 97], a posé le problème du rôle que pourraient jouer des coenzymes analogues dans le cas général. Dans le cas des glycogène-phosphorylases [31, 89], on possède quelques indices encourageants de la fécondité de cette hypothèse. En ce qui concerne les transferts de fructosyl, on en est réduit à constater que nous ne savons rien et que ce problème reste posé aux biochimistes.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

J'ai étudié, dans le présent travail, la préparation de la lévane-sucrase de *Bacillus subtilis*, la purification des extraits enzymatiques, et quelques aspects du mode d'action de l'enzyme.

1° L'activité de l'enzyme a été étudiée et mesurée au moyen de la chromatographie sur papier qualitative et quantitative des glucides formés par l'action de l'enzyme sur le saccharose.

2° L'activité de l'enzyme peut être mesurée plus rapidement par une méthode manométrique : le glucose libéré par l'activité de la lévane-sucrase sur le saccharose est oxydé quantitativement en présence d'air et de glucose-oxydase; on mesure l'oxygène consommé.

3° L'analyse des glucides radioactifs, produits par action de l'enzyme pendant un temps très court, a été faite par photométrie des radio-autogrammes des produits de la réaction, après leur développement chromatographique. Cette méthode a permis d'étudier la cinétique de la réaction.

4° La synthèse de lévane-sucrase dans les cultures de *Bacillus subtilis* a été étudiée en vue de connaître les conditions optima de production de l'enzyme. La synthèse de la lévane-sucrase est strictement adaptative et nécessite la présence de substrat (saccharose). La présence de glucose inhibe la formation de lévane, mais ne gêne pas la formation d'enzyme.

5° L'enzyme peut être extrait avec un mauvais rendement des cellules de *B. subtilis*. L'activité peut être séparée par centrifugation fractionnée et précipitation au sulfate d'ammonium. La fraction active contient toujours de la lévane. Les cellules ne contiennent qu'une portion faible de l'activité totale des cultures.

6° Contrairement à ce qui était admis précédemment, le liquide de culture est riche en lévane-sucrase. L'enzyme du milieu est

adsorbable sur terre d'infusoires. La méthode de purification comprend trois stades :

- a) centrifugation à haute vitesse ;
- b) précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium entre 65 et 85 % de la saturation;
- c) électrophorèse sur colonne de gélose.

La purification finalement obtenue est de 24 par rapport à l'azote protéique. La préparation purifiée ne contient plus de polyoside détectable par chromatographie sur papier.

7° Les propriétés électrophorétiques de l'enzyme montrent un déplacement monophasique à divers pH. Le point isoélectrique est au voisinage de pH 4.0.

8° Le pH optimum d'activité est voisin de 5,8, il est identique à celui de l'enzyme d'*Aerobacter levanicum*.

9° La réaction de synthèse de lévane à partir du saccharose, en présence de l'extrait enzymatique, est réversible à partir de lévane et de glucose. La constante d'équilibre de la réaction à 37°, pH 6,2 est $K = 0,037$. L'énergie de liaison osidique de la lévane est voisine de 4.000 calories.

10° La réversibilité de la réaction fournit un nouveau mode de synthèse du saccharose qui a été isolé et caractérisé. Le glucose peut être remplacé dans la réaction par une série d'aldoses possédant certains caractères stériques communs.

J'ai pu montrer qu'il se formait alors les produits suivants dont l'analyse partielle a été faite par des méthodes chromatographiques et enzymatiques.

β -D-fructofuranoside 1 $\rightarrow$ 2 D xyloside

β -D-fructofuranosido 1 $\rightarrow$ 2 D galactoside

β -D-fructofuranosido 1 $\rightarrow$ 2 L-arabinoside

11° La lévane ajoutée au début de la réaction accélère la synthèse enzymatique de lévane à partir du saccharose, et diminue la formation de fructose libre. La lévane se comporte comme un précurseur de sa propre synthèse et peut former un complexe labile distinct avec l'enzyme. Le précurseur exerce aussi une influence sur la nature de la lévane formée.

12° J'ai étudié la cinétique de la réaction catalysée par la lévane-sucrase, en présence et en l'absence de précurseur.

J'ai pu ainsi calculer la constante de Henri et Michaelis-Menten du complexe enzyme saccharose ($K_s = 9 \cdot 10^{-2}$ M à pH 6,2 $t^\circ = 37^\circ$)

et du complexe enzyme-lévane ($K_s = 10 \cdot 10^{-3}$ M dans les mêmes conditions).

La lévane précurseur se comporte comme un inhibiteur non compétitif de la formation du fructose et des oligosides et comme un activateur de sa propre synthèse. Le saccharose peut accepter du fructosyl transféré par l'enzyme, mais il ne possède pour l'enzyme aucune affinité.

13° Dans mes extraits purifiés, le même facteur est responsable à la fois de la synthèse de lévane, de l'hydrolyse du saccharose, et de la synthèse d'oligosides.

14° Un schéma du mode d'action de l'enzyme a été proposé en tenant compte de ces résultats expérimentaux.

Suivant ce schéma, le substrat se fixe réversiblement sur un emplacement de l'enzyme, avec une affinité mesurable, et une spécificité stérique déterminée par la position de certains oxhydriles de l'aldose accompagnant le fructosyl du substrat.

En présence de lévane précurseur, le fructosyl du complexe précédent est transféré et allonge d'une unité la chaîne du précurseur, lié lui aussi réversiblement à l'enzyme.

En l'absence de précurseur, le fructosyl est accepté par l'eau ou un accepteur non spécifique, il se forme ainsi du fructose ou des oligosides.

Dans chaque cas, du glucose ou un autre aldose est libéré stoechiométriquement.

15° Les propriétés de la lévane-sucrase rapprochent cet enzyme de diverses transglycosidases.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALBON N., BELL D.J., BLANCHARD P.H., GROSS D. et RUNDALL J.T.
— *J. Chem. Soc. G. B.*, p. 24, 1953.
2. ALM R. S., WILLIAMS R.J.P. et TISELIUS A. — *Acta Chem. Scandin.*,
6, 826, 1952.
3. ASCHNER M., AVINERI-SHAPIRO S. et HESTRIN S. — *Nature G. B.*,
149, 527, 1942.
4. AVIGAD G., FEINGOLD S. et HESTRIN S. — *Biophys. Biochim. Acta*,
20, 129, 1956.
5. AVINERI-SHAPIRO S. et HESTRIN S. — *Biochem. J.*, 39, 167, 1945.
6. BACON J.S.D. — *Biochem. J. (Proc.)*. — 50, 18, 1952.
7. BACON J.S.D. — *Biochem. J.*, 57, 320, 1954.
8. BACON J.S.D. et BELL D.J. — *J. Chem. Soc.*, p. 2528, 1953.
9. BACON J.S.D. et EDELMAN J. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 28, 467,
1950.
10. BACON J.S.D. et EDELMAN J. — *Biochem. J.*, 48, 114, 1951.
11. BARKER S.A. et BOURNE E.J. — *Quarterly Rev. G.B.*, 7, 56, 1953.
12. BATHIA I.S., SATYANARAYANA M.N. et SRINIVASAN M. — *Biochem. J.*,
61, 171, 1955.
13. BEALING F.J. — *Biochem. J.*, 55, 93, 1953.
14. BEALING F.J. et BACON J.S.D. — *Biochem. J.*, 53, 277, 1953.
15. BEIJERINCK M.W. — *Proc. Köninkl. Nederland Akad. Wetens.*
Amsterdam Proc. Sect. Sci., 12, 635 et 795, 1910.
16. BEIJERINCK M.W. — *J. Soc. Chem. Indust. G.B.*, 29, 710, 1910.
17. BEIJERINCK M.W. — *Chem. Zentralb.*, 11, 147, 1910.
18. BEIJERINCK M.W. — *Folia Microbiol.*, 1, 377, 1912.
19. BEIJERINCK M.W. — *Zentralb. Biochem. u. Biophys.*, 14, 679, 1912.
20. BELL D.J. et DEDONDER R. — *J. Chem. Soc. G.B.*, p. 2867, 1954.
21. BLANCHARD P.H. et ALBON N. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 29, 220,
1950.

22. BOURNE E.J., HAWORTH W.N. et PEAT S. — *Nature*, 154, 276, 1944.
23. BUSSARD A. et PERRIN D. — *J. Labor. Clin. Med.*, 46, 689, 1955.
24. CARDINI C.E. et LELOIR L.F. — *J. Biol. Chem.*, 214, 157, 1955.
25. CHALLINOR S.W., HAWORTH W.N. et HIRST E.L. — *J. Chem. Soc. G.B.*, p. 676, 1934.
26. COHN M. — *J. Biol. Chem.*, 180, 771, 1949.
27. COLE, HANES, JACKSON et LOUGHAM. — Non publié. D'après R. DEDONDER et C. NOBLESSE (référence n° 39).
28. COOPER E.A. — *J. Soc. Chem. Ind. G.B.*, 58, 229, 1939.
29. COOPER E.A. et PRESTON J.F. — *Biochem. J.*, 29, 2267, 1935.
30. CORI C.T. et CORI C.F. — *J. Biol. Chem.*, 131, 397, 1939.
31. CORI G.T., CORI C.F. et GREEN A.A. — *J. Biol. Chem.*, 151, 39, 1943.
32. CORI C.T., CORI C.F. et SCHMIDT G. — *J. Biol. Chem.*, 129, 629, 1939.
33. CORI C.F., SCHMIDT G. et CORI G.T. — *Science, U.S.A.*, 89, 464, 1939.
34. CORI G.T. et CORI C.F. — *J. Biol. Chem.*, 158, 321, 1945.
35. COTÉ R. — Non publié. Cité par A. BUSSARD et D. PERRIN (référence n° 23).
36. COULTHARD C.E., MICHAELIS R., SHORT W.F., SYKES G., SKRIMSHIRE G.E.M., STANDFAST A.F.B., BIRKINSHAW J.H. et RAISTRICK H. — *Biochem J.*, 39, 24, 1945.
37. DEDONDER R. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34, 144, 1952.
38. DEDONDER R. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34, 171, 1952.
39. DEDONDER R. et NOBLESSE C. — *Ann. Inst. Pasteur*, 85, 356, 1953.
40. DEDONDER R. et PÉAUD-LENOËL C. — *C.R. Acad. Sci.*, 234, 325, 1954.
41. DEDONDER R. et SLISZEWITZ G. — Résultats non publiés.
42. DENTICE DI ACCADIA F., RUSSI S. et BALLIO A. — *R.C. Ist. Sup. Sanità, Roma*, 18, 1066, 1955.
43. DIENES L. — *J. Infect. Dis.*, 57, 23, 1935.
44. DOUDOROFF M. — *J. Biol. Chem.*, 151, 351, 1943.
45. DOUDOROFF M. — *Fed. Proc.*, 4, 241, 1945.
46. DOUDOROFF M., BARKER H.A. et HASSID W.Z. — *J. Biol. Chem.*, 168, 725, 1947.
- 47 b. DUTTON G.J. et STOREY I.D.E. — *Biochem. J. (Proc.)*, 53, 37, 1953.
48. EDELMAN J. — *Biochem. J.*, 57, 22, 1954.
49. EDELMAN J. et BEALING F.J. — *Biochem. J. (Proc.)*, 53, 2, 1953.
50. FEINGOLD D., AVIGAD G. et HESTRIN S. — *Bull. Research Council, Israël*, 5 A, 98, 1955.
51. FERNBACH F. et SCHOEN M. — *Ann. Brass. Distill.*, 15, 289, 1912.

52. FISCHER E.H., KOHTES L. et FELLIG J. — *Helv. Chim. Act.*, 34, 1132, 1951.
53. FISKE C.H. et SUBARROW Y. — *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925.
- 53 b. FITTING C. et DOUDOROFF M. — *J. Biol. Chem.*, 199, 153, 1952.
54. FLODIN P. et PORATH J. — *Biochim. Biophys. Act.*, 13, 175, 1954.
55. FORSYTH W.G.C. et WEBLEY D.M. — *Nature, G.B.*, 162, 150, 1948.
56. FORSYTH W.G.C. et WEBLEY D.M. — *J. Gen. Microbiol.*, 4, 87, 1950.
57. FRIEDENWALD S. et MAENGWYN-DAVIES G.D. — Elementary kinetic theory of enzyme activity (First order theory) In *A symposium on the mechanism of enzyme action*. W.D. McElroy et B. Glass éd., J. Hopkins Press, Baltimore, U.S.A., p. 154, 1954.
58. GENGHOF D.S., HEHRE E.J. et NEILL J.M. — *Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.*, 61, 339, 1946.
59. GLASER F. — *Zentr. f. Bakt.*, 1, 879, 1895. (Cité par W.L. OWEN, référence n° 109.)
60. GORDON A.H., KEIL B., SEBESTA K., KNESSL O. et SORM F. — *Coll. Cze. Chem. Com.*, 15, 1, 1950.
61. GOTTSCHALK A. — *Adv. Carbohydr. Chem.*, 5, 49, 1950.
62. GRELET N. — *Ann. Inst. Pasteur*, 81, 430, 1951.
63. GREIG-SMITH R. — *Proc. Linnean Soc. N.S. Wales*, 26, 589, 1901.
64. GREIG-SMITH R. et STEEL T. — *J. Soc. Chem. Indust.*, 21, 1381, 1902.
65. HANES C.S. — *Proc. Roy. Soc. London, B.*, 128, 421, 1940.
66. HANES C.S. — *Proc. Roy. Soc. London, B.*, 129, 174, 1940.
67. HANES C.S. — *Nature, G.B.*, 145, 348, 1940.
68. HARRISSON F.C., TARR H.L.A. et HIBBERT H. — *Canad. J. Research*, 3, 449, 1930.
69. HASSID W.Z. — Metabolism of polysaccharides and disaccharides. In *A symposium on phosphorus metabolism*. W.D. McElroy and B. Glass éd., J. Hopkins Press, Baltimore, U.S.A., p. 24, 1951.
70. HASSID W.Z. et DOUDOROFF M. — *Adv. in Enzymol.*, 10, 123, 1950.
71. HEHRE E.J. — *Science, U.S.A.*, 93, 237, 1941.
- 71 b. HEHRE E.J. — *J. Biol. Chem.*, 177, 943, 1949.
72. HEHRE E.J. — *Adv. Carbohydr. Chem.*, 8, 277, 1953.
73. HEHRE E.J., GENGHOF D.S. et NEILL J.M. — *J. Immunol.*, 51, 5, 1945.
- 73 b. HEHRE E.J. et HAMILTON D.M. — *J. Biol. Chem.*, 192, 161, 1951.
74. HEHRE E.J. et NEILL J.M. — *J. Exp. Biol. Med.*, 83, 147, 1946.
75. HEHRE E.J. et SUGGS J.Y. — *J. Exp. Med.*, 75, 339, 1942.
76. HELLMAN N.N., TSUCHIYA H.M., ROGOVIN S.P., LAMBERTS B.L., TOBIN R., GLASS C.A., STRINGER C.S., JACKSON R.W., et SENTI F.R. *Ind. Eng. Chem.*, 47, 1593, 1955.
77. HENRI V. — Lois générales de l'action des diastases. *Thèse de Doctorat*, Paris, 1903.

78. HESTRIN S., AVINERI-SHAPIRO S. et ASCHNER M. — *Biochem. J.*, 37, 450, 1943.
79. HESTRIN S. et AVINERI-SHAPIRO S. — *Nature, G.B.*, 152, 49, 1943.
80. HESTRIN S. et AVINERI-SHAPIRO S. — *Biochem. J.*, 38, 2, 1944.
81. HESTRIN S., FEINGOLD D.S. et AVIGAD G. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 77, 6710, 1955.
82. HIBBERT H. et BRAUNS F. — *Canad. J. Research*, 4, 596, 1931.
83. HIBBERT H., TIPSON R.S. et BRAUNS F. — *Canad. J. Research*, 4, 221, 1931.
84. HOUGH L., JONES J.K.N. et WADMAN W.H. — *J. Chem. Soc. G.B.*, p. 2511, 1949.
85. INGELMAN B. et SIEGBAHN K. — *Nature, G.B.*, 154, 237, 1944.
86. JEANES A. et WILLIAM C.A. — *J. Biol. Chem.*, 176, 603, 1948.
87. JOHNSON M.J. — *J. Biol. Chem.*, 137, 575, 1941.
88. KALCKAR H.M. — *Fed. Proc.*, 4, 248, 1945.
89. KALCKAR H.M. — The mechanism of transglycosidation. In *A symposium on the Mechanism of enzyme action*. W.D. Mc Elroy et B. Glass éd., J. Hopkins Press, Baltimore, U.S.A., p. 675, 1954.
90. KIESSLING W. — *Naturwiss.*, 27, 129, 1939.
91. KOHANYI G. et DEDONDER R. — *C.R. Acad. Sc.*, 233, 1142, 1951.
92. KOPELOFF N., KOPELOFF L. et WELCOME C.J. — *J. Biol. Chem.*, 43, 171, 1920.
93. KOSHLAND D.E. Jr. et STEIN S.S. — *Fed. Proc.*, 12, 233, 1953.
94. LAIDLAW R.A. et REID S.G. — *J. Chem. Soc. G.B.*, p. 1830, 1951.
95. LELOIR L.F. et CABIB E. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 5445, 1953.
96. LELOIR L.F. et CARDINI C.E. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 6084, 1953.
97. LELOIR L.F., CARDINI C.E. et CHIRIBOGA J. — *J. Biol. Chem.*, 214, 149, 1955.
98. LEVI I. et PURVES C.B. — *Adv. Carbohyd. Chem.*, 4, 1, 1949.
99. LINEWEAVER H. et BURK D. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 658, 1934.
100. LYNE R.R., PEAT S. et STACEY M. — *J. Chem. Soc. G.B.*, p. 237, 1940.
101. MATTOON J.R., HOLMLUND C.E., SCHEPARTZ S.A., VAVRA J.J. et JOHNSON M.J. — *Applied Microb.*, 3, 321, 1955.
102. MICHAELIS L. et MENTEN M.L. — *Biochem. Z.*, 49, 333, 1913.
103. MITCHELL W. et HIBBERT H. — *Canad. J. Research*, 7, 345, 1932.
- 103 b. MONOD J. et TORRIANI A.M. — *Ann. Inst. Pasteur*, 78, 65, 1950.
104. NELSON N. — *J. Biol. Chem.*, 153, 375, 1944.
105. NIVEN C.F., SMILEY K.L. et SHERMAN J.M. — *J. Biol. Chem.*, 140, 103, 1941.
106. OERSKOV J. — *Zentr. Bakt. Parasitenk. I., Orig.*, 120, 310, 1931.

107. OPARINE A.I. et BARDINSKAIA M.S. — *Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R.*, 94, 305, 1954.
108. OWEN W.L. — *J. Ind. Eng. Chem.*, 3, 481, 1911.
109. OWEN W.L. — *J. Bact.*, 8, 421, 1923.
110. PALMER A. — *Biochem. J.*, 48, 389, 1951.
111. PARTRIDGE S.M. — *Biochem. J.*, 42, 238, 1948.
112. PAZUR J.H. — *J. Biol. Chem.*, 199, 217, 1952.
113. PEAT S., WHELAN W.J. et REES W.R. — *J. Chem. Soc., G.B.*, p. 44, 1956.
114. PÉAUD-LENOËL C. — *C.R. Acad. Sc.*, 241, 1518, 1955.
115. PÉAUD-LENOËL C. — *C.R. Acad. Sc.*, 242, 1772, 1956.
116. PÉAUD-LENOËL C. et DEDONDER R. — *C.R. Acad. Sc.*, 239, 203, 1954.
117. PÉAUD-LENOËL C. et DEDONDER R. — *C.R. Acad. Sc.*, 241, 1418, 1955.
118. RABATÉ M.J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 17, 572, 1935.
119. RAYBIN H. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 59, 1402, 1937.
120. ROE J.H. — *J. Biol. Chem.*, 107, 15, 1934.
121. SCHAFFNER A. et SPECHT H. — *Naturwiss.*, 26, 494, 1938.
122. SEGAL H.L., KACHMAR J.F. et BOYER P.D. — *Enzymology*, 15, 187, 1952.
123. SRINAVASAN M. et BATHIA S. — *Biochem. J.*, 55, 286, 1953.
124. STACEY M. — *J. Chem. Soc., G.B.*, p. 853, 1947.
125. STACEY M. — *Nature, G.B.*, 149, 639, 1942.
126. STACEY M. — *Adv. Enzymol.*, 15, 313, 1954.
127. STACEY M. — *Chem. and Indust.*, 62, 110, 1943.
128. TIPSON R.S. et BRAUNS F. — 1931. (Voir référence 83.)
129. TSUCHIYA H.M., HELLMAN N.N., KOEPSSELL H.J., CORMAN J., STRINGER C.S., ROGOVIN S.P., BOGART M.O., BRYANT G., FEGER V.H., HOFFMAN C.A., SENTI F.R. et JACKSON R.W. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 77, 2412.
130. VAN NIEL C.B. — *Ann. Rev. Biochem.*, 12, 551, 1943.
131. VIEBEL S. — *Biochem. J.*, 32, 1949, 1938.
132. WALLENFELS K. — *Naturwiss.*, 37, 491, 1950.
133. WHELAN W.J. et BAILEY J.M. — *Biochem. J.*, 58, 560, 1954.
134. WHELAN W.J. et JONES D.M. — *Biochem. J. (Proc.)*, 54, 34, 1953.
135. WHISTLER R.L. et DURSO D.F. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 677, 1950.
136. WHITE J.W. et SECOR G.E. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 36, 490, 1952.
137. WILLIAMS K.T. et BEVENUE A. — *Science, U.S.A.*, 113, 582, 1951.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
I. — Historique	5
II. — Propriétés des extraits enzymatiques.....	8
III. — Rapports entre la lévane-sucrase et les enzymes voisins.	13
IV. — Conclusions	15
CHAPITRE PREMIER. — <i>Matériaux et méthodes</i>	17
I. — Produits employés	17
II. — Souches et milieux de culture.....	18
III. — Méthodes analytiques	18
CHAPITRE II. — <i>Extraction et purification de la lévane-sucrase</i>	31
I. — Production de l'enzyme	31
II. — Préparation d'extraits enzymatiques à partir de cellules bactériennes	32
III. — Préparation d'extraits enzymatiques à partir de liquides de culture de <i>Bacillus subtilis</i>	33
CHAPITRE III. — <i>Etude de quelques propriétés de la lévane-sucrase</i> .	45
I. — Action du pH sur l'enzyme de <i>Bacillus subtilis</i>	45
II. — Réversibilité de la réaction enzymatique : synthèse du saccharose	48
III. — Synthèse de diholosides analogues du saccharose....	51
IV. — Effet de la lévane employée comme précurseur sur le bilan de la réaction	55
V. — Bilan de la réaction catalysée par la lévane-sucrase, en présence de saccharose radioactif	59
IV. — Etude cinétique de la réaction.....	62
CHAPITRE IV. — <i>Discussion</i>	69
I. — Unicité ou multiplicité des facteurs contenus dans les extraits enzymatiques	69
II. — Propriétés physico-chimiques de l'enzyme.....	74
III. — Mécanisme de la réaction	75
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	87
BIBLIOGRAPHIE	90

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

SYNTHÈSE BIOLOGIQUE DU LACTOSE

Vu et approuvé :

Paris, le 5 Janvier 1957

Le Doyen de la Faculté des Sciences

J. PÉRES

Vu et Permis d'imprimer :

Le recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH

